N° D'ORDRE au C.N.R.S.
AO. 11383

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Abdelkader AYADI

Etude thermodynamique d'échanges d'ions alcalins par la LEMNA MINOR, L. : Interprétation des effets d'ions alcalino-terreux.

(TOME 1)

Présentée et soutenue le 23 Mai 1975

P. ROLLIN	Doyen de la Faculté des Sciences de ROUEN	Président
R. HELLER	Professeur à l'Université de PARIS VII	Rapporteur
J. CHANU	Professeur à l'Université de PARIS VII	Examinateurs
G. DUCET	Professeur à l'Université de MARSEILLE-LUMINY	Examinateurs
M. THELLIER	Professeur à l'Université de ROUEN	Examinateurs

[illegible]

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Abdelkader AYADI

Etude thermodynamique d'échange d'une zéolithe par la [illegible] : interprétation des effets d'ions alcalino - terreux

(TOME I)

Présentée et soutenue le [illegible]

[illegible]

N° D'ORDRE au C.N.R.S.
AO. 11383

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Abdelkader AYADI

Etude thermodynamique d'échanges d'ions alcalins par la LEMNA MINOR, *L.* : Interprétation des effets d'ions alcalino-terreux.

(TOME 1)

Présentée et soutenue le 23 Mai 1975

P. ROLLIN	Doyen de la Faculté des Sciences de ROUEN	Président
R. HELLER	Professeur à l'Université de PARIS VII	Rapporteur
J. CHANU	Professeur à l'Université de PARIS VII	Examinateurs
G. DUCET	Professeur à l'Université de MARSEILLE-LUMINY	
M. THELLIER	Professeur à l'Université de ROUEN	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été commencé à la Faculté des Sciences de Tunis, et poursuivi pour l'essentiel à l'Université de Rouen et dans le cadre du Laboratoire associé au C.N.R.S. "Phytochrome et Perméabilité Membranaire".

J'éprouve une vive gratitude à l'égard des autorités de la République Tunisienne qui m'ont donné les premiers moyens de faire de la recherche scientifique à Tunis, puis qui ont montré la compréhension nécessaire pour m'accorder l'autorisation de venir en France conduire ce long travail à son terme.

Je suis également très reconnaissant aux autorités universitaires françaises, et tout particulièrement au Centre National de la Recherche Scientifique qui m'a accordé un contrat de chercheur, pour m'avoir procuré les moyens de poursuivre mon travail dans les meilleures conditions.

C'est avec Monsieur DUCET, alors professeur à l'Université de Tunis, que je suis entré dans le cadre de l'Enseignement Supérieur. Il a été mon professeur et c'est sous sa vigoureuse impulsion que le Laboratoire de Biologie Végétale de Tunis a commencé à s'organiser, et que j'ai appris à aimer la Physiologie Végétale. Les discussions passionnées qu'il aime susciter et animer m'ont toujours été depuis un enseignement profitable.

C'est avec Monsieur le Professeur THELLIER que j'ai commencé mon travail de recherche ; après, maintenant, plus de dix ans passés auprès de lui, d'abord à Tunis puis à Rouen, j'ai le sentiment que nous avons formé une véritable équipe, où nos efforts ont été complémentaires, et nos relations basées sur la confiance réciproque et l'amitié beaucoup plus que sur des rapports hiérarchiques. Je souhaite que nous puissions continuer encore longtemps dans cet esprit.

C'est également en Tunisie que j'ai profité des enseignements de Monsieur le Professeur HELLER, à l'occasion des cours qu'il venait faire à notre D.E.A. J'ai été séduit par la rigueur et la clarté de ses analyses scientifiques, et je suis heureux de pouvoir continuer à bénéficier de ses critiques et suggestions, notamment dans le cadre des séances de travail de notre R.C.P.

Monsieur le Professeur WURMSER, Membre de l'Institut, a bien voulu accepter d'être mon parrain scientifique au C.N.R.S. La profondeur de son jugement scientifique, ses critiques et ses analyses des Notes, que nous lui soumettions au fur et à mesure de l'avancement du travail du Laboratoire, m'ont beaucoup impressionné ; et je le prie de trouver, ici, le témoignage de mon respectueux attachement.

Comme tout notre Laboratoire, je dois beaucoup à Monsieur CHANU, Professeur à l'Université de Paris VII, pour les enseignements qu'il est venu faire à notre D.E.A. et pour les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer dans l'utilisation, parfois délicate, des concepts de la Thermodynamique.

Monsieur le Professeur ROLLIN, malgré le poids de ses charges administratives de Doyen, a bien voulu rester en contact étroit avec le détail du travail de laboratoire : c'est sous son impulsion personnelle qu'ont pu se développer, avec certains membres de son équipe, et tout particulièrement Jean BOISARD, des collaborations qui m'ont été précieuses.

Enfin, j'ai travaillé pendant plusieurs années en collaboration avec Thérèse STELZ et Alain MONNIER et bénéficié souvent de l'aide de Arlette et Bernard THOIRON. Je profite de cette circonstance pour les assurer de mon amicale reconnaissance.

Je remercie également Maurice DEMARTY, Jean Paul LASSALLES et Walter HORST (Laboratoire du Professeur MARSCHNER à Berlin) pour leur contribution à ce travail ainsi que Henri MORVAN (Laboratoire du Professeur BOURIQUET à Lille) d'avoir apporté sa collaboration en ce qui concerne les mesures d'électrophysiologie.

Madame VAUTRAIN, Mademoiselle OCTAU et Monsieur ALDEGUER qui ont participé à la réalisation matérielle de ce mémoire, trouveront ici l'expression de ma vive reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544702_0018

S O M M A I R E

INTRODUCTION

I - HISTORIQUE : PROBLEME DES FLUX D'IONS ECHANGES PAR UN VEGETAL 5

I.1. ASPECT EXPERIMENTAL DES ETUDES CINETIQUES DE L'ABSORPTION 5

I.2. FORMULATION CLASSIQUE DES MESURES DE FLUX 7

I.2.1. APPROCHE THEORIQUE DE KING ET ALTMAN (1956) 7

I.2.2. HYPOTHESES SIMPLIFICATRICES 9

I.3. APPLICATION A LA DESCRIPTION DES ECHANGES TRANSMEMBRANAIRES 12

I.4. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ETUDE DES FLUX D'IONS ALCALINS ET ROLE DES IONS ALCALINO-TERREUX ET LEUR INTERPRETATION EN TERMES MICHAELIENS 14

I.4.1. POSITION DU PROBLEME 14

I.4.2. EFFET DES ALCALINO-TERREUX 15

I.5. DIFFICULTES THEORIQUES DES MODELES MECANISTIQUES (MICHAELIENS) 16

I.6. LES MODELES MACROSCOPIQUES 17

I.7. LA FORMULATION "ELECTROCINETIQUE" 18

I.7.1. APPROCHE THERMODYNAMIQUE

I.7.2. DESCRIPTION DU MODELE ELECTROCINETIQUE 18

I.7.3. APPLICATION DU MODELE A LA DESCRIPTION DES INTERACTIONS IONIQUES 19

I.7.4. EXTENSION DU FORMALISME 20

II - MATERIEL ET TECHNIQUES 22

II.1. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE 22

II.2. CADRE GENERAL D'EXPERIENCE 23

II.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL 24

II.3.1. CAS DE L'ABSORPTION 24

II.3.2. CAS DE LA COMPARTIMENTATION 24

II.4. MESURES DE RADIOACTIVITE 26

II.4.1. MESURES EN SCINTILLATION LIQUIDE 26

II.4.2. MESURES EN SCINTILLATION SOLIDE 27

II.5. DOSAGE DU POTASSIUM ET DU RUBIDIUM PAR SPECTROGRAPHIE DE FLAMME 27

III - SIGNIFICATION DES FLUX 29

III.1. HYPOTHESES FONDAMENTALES 29

III.2. MISE EN EQUATION DU PROBLEME 30

III.3. RESOLUTION DU SYSTEME D'EQUATIONS 32

III.3.1. PRINCIPE 32

III..3.2. UTILISATION DE LA TRANSFORMEE DE LAPLACE-CARSON 32

III.3.3. TRANSFORMATION RETOUR 35

III.4. ACQUISITION DES DONNEES CINETIQUES 37

III.4.1. DECOMPOSITION DES COURBES D'EXSORPTION 37

III.4.2. RECHERCHE DES CARACTERISTIQUES CELLULAIRES DE L'ECHANGE DANS LE CAS D'UNE ACTIVITE SPECIFIQUE DE DEPART IDENTIQUE POUR TOUS LES COMPARTIMENTS 38

III.4.2.1. Calcul théorique 40

III.4.2.2. Application numérique 42

III.4.3. INTERPRETATION 46

III.4.4. CONSEQUENCE : IMPORTANCE DE LA REEXSORPTION AU COURS D'UNE CINETIQUE D'ABSORPTION 46

IV - DEFINITION DE LA FORCE D'ECHANGE 49

IV.1. ETUDE EXPERIMENTALE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE 50

IV.2. ETUDE DU TERME (s_e) 52

IV.3. ETUDE DE LA PAROI 54

IV.3.1. DOSAGE DES CHARGES FIXES 54

IV.3.2. EXCLUSION DE DONNAN 55

IV.3.2.a. Rappel théorique : Equation de Donnan 55

IV.3.2.b. Confrontation à l'expérience 56

V - APPLICATION DE LA FORMULATION THERMODYNAMIQUE A NOS ESSAIS D'ABSORPTION 61

V.1. CONDITIONS STATIONNAIRES ET VITESSES INITIALES D'ABSORPTION 61

V.2. ABSORPTION EN FONCTION DES DOSES 62

V.3. CAS D'UNE INTERACTION COMPETITIVE : MODIFICATION DU PARAMETRE π 64

V.4. EFFET DES IONS ALCALINO-TERREUX SUR L'ABSORPTION DU RUBIDIUM ET DU POTASSIUM 65

V.4.1. MODIFICATION DES PARAMETRES π ET L 65

V.4.2. MODIFICATION DU PARAMETRE ε 67

VI - CONCLUSION GENERALE 69

PRINCIPAUX SYMBOLES UTILISES

D	coefficient de Diffusion
E	énergie d'activation
F	le Faraday
J_i	flux du constituant i
K_m	Constante de Michaelis
k	constante de Boltzmann
k_D	constante de Diffusion
k_{ij}	constante de vitesse
k_m	constante de Michaelis dans l'équation (14)
$k_1, k_2, \ldots$	constantes de vitesse (aller)
$k_{-1}, k_{-2}, \ldots$	constantes de vitesse (retour)
L_{ij}	coefficient phénoménologique
R	constante des gaz parfaits $(J \cdot M^{-1} \cdot {}^{\circ}K^{-1})$
S	substrat
S_e	substrat à l'extérieur
S_i	substrat à l'intérieur
T	température absolue
V_m	vitesse maximum à saturation
V_1	volume de paroi correspondant à 1 g de matière fraîche
V_2	volume de cytoplasme correspondant à 1 g de matière fraîche
V_3	volume de vacuole correspondant à 1 g de matière fraîche
v	vitesse d'absorption
v_i	vitesse instantanée
X_j	force généralisée

Z	valence
Φ_{ij}	flux du compartiment i vers le compartiment j
μ_0	potentiel chimique standard
ψ	potentiel électrique
(X)	activité de X
$[X]$	concentration de X

INTRODUCTION

Les cellules vivantes, systèmes ouverts du point de vue de la thermodynamique, procèdent continuellement à des échanges de matière avec le milieu extérieur : gaz (en particulier oxygène et gaz carbonique), eau, ions minéraux et substances organiques.

Ces échanges se font à travers les membranes lipoprotéiques des cellules, de façon purement diffusive pour une part (généralement faible, d'ailleurs, en ce qui concerne les ions et les substances organiques). Mais dans la mesure où certains échanges correspondent à la couverture de besoins bien spécifiques de la cellule (ions minéraux tels que le nitrate, le sulfate, le potassium, etc..., ou substances organiques telles que le glucose, certains galactosides, etc...), on constate que ceux-ci sont assurés, pour l'essentiel, par des dispositifs catalytiques également spécifiques.

Dans le détail, le fonctionnement de ces dispositifs est encore mal connu. Il ne fait plus de doute maintenant que des protéines y jouent un rôle essentiel; mais on ne peut imaginer que le mécanisme de leur intervention puisse se ramener à celle de molécules dissoutes, en conditions homogènes et isotropes, comme pour les plus simples des réactions enzymatiques : au contraire, il est probable que les interactions (entre molécules actives, avec le reste de la structure membranaire, avec des molécules de couplage énergétique, etc...) ne peuvent pas être négligées, et que c'est toute une architecture locale de la membrane qui constitue un site spécifique de transfert transmembranaire. Il n'est même pas exclu que ces sites ne soient pas stables, mais soumis à des remaniements plus ou moins rapides !

Ainsi, faute de connaissances plus précises dans l'état actuel des choses, il faudra nous contenter de dire que les membranes cellulaires possèdent des "édifices catalytiques" caractéristiques de chaque type d'échange spécifique.

Deux voies, complémentaires, mais partant de points de vue totalement différents, peuvent être envisagées pour aborder l'étude de ces édifices catalytiques.

La première envisage le problème au niveau microscopique. C'est une démarche essentiellement analytique où l'on essaie de séparer, d'identifier et

d'étudier les protéines constitutives des édifices catalytiques de transfert. Ce type de recherches conduit à la détermination de paramètres moléculaires précis sur des protéines mises en jeu dans le transfert ; mais, par son principe même, il implique toujours plus ou moins la destruction, la dissociation des édifices catalytiques du transfert étudié qui perdent ainsi leur rôle fonctionnel au cours des traitements. Des résultats extrêmement importants ont été obtenus déjà, par cette voie, dont on trouvera la synthèse dans PARDEE (1968), KEPES (1971), KABACK (1970, 1972, 1974).

La deuxième voie, qui est celle que j'ai suivie dans mon travail, consiste, au contraire, à étudier les échanges transmembranaires, sur des systèmes vivants non dissociés, par des mesures de flux de substances échangées en relation avec les contraintes imposées (par exemple les concentrations, le pH, la température, etc...). Cette démarche renseigne ainsi sur le fonctionnement global des systèmes d'échanges ; mais, les mesures étant toutes purement macroscopiques (elles reviennent à des mesures de flux et de forces), on n'a aucune raison théorique, à priori, d'attendre que des renseignements moléculaires puissent être obtenus par cette voie.

On constate ainsi une sorte de dualisme, où la description des édifices catalytiques des transferts transmembranaires peut être faite soit par un jeu de paramètres moléculaires mécanistiques, soit par un jeu de paramètres fonctionnels macroscopiques. Naturellement, les chercheurs ont souhaité trouver des possibilités de passage de l'un des niveaux de description à l'autre ; mais, et ce sera l'un des points sur lesquels j'insisterai le plus dans le texte, ce passage entre niveaux microscopique et macroscopique pose des problèmes théoriques difficiles, et ne peut sans doute pas être effectué aussi simplement qu'il l'a semblé à différents chercheurs.

0

0 0

Du point de vue expérimental, ce sont surtout les microorganismes (et tout particulièrement les bactéries qui présentent l'intérêt de ne posséder qu'une seule membrane) qui ont été utilisés comme matériel d'expérience (COHEN et MONOD 1957, ELLIS 1964, KEPES 1971, KABACK 1970). Très commodes aussi ont été les systèmes monocellulaires ou coenocytiques géants (Mac ROBBIE 1971, GILLET et LEFEBVRE 1973).

Mais il fallait bien étudier aussi le fonctionnement des processus d'échanges cellulaires chez les systèmes multicellulaires, où il n'est, bien sûr, pas évident que les résultats obtenus à l'aide des systèmes précédents puissent se transposer purement et simplement. En particulier, l'étude des processus d'échanges ioniques spécifiques, qui jouent un rôle si important dans

l'économie des végétaux supérieurs, méritait aussi d'être abordée ; et, ne serait ce qu'en raison de leurs conséquences pratiques, en agronomie, de telles études ont effectivement été abordées déjà par de très nombreux chercheurs depuis plus de vingt ans. Le matériel utilisé alors, pour ce faire a été assez variable : systèmes racinaires excisés (LEGGETT et EPSTEIN 1956, EPSTEIN, RAINS et ELZAM 1963, HOOYMANS 1964, SALZAC 1973), fragments de tubercules, fragments de feuilles, etc... et plus récemment cultures de tissus ou cultures de suspensions cellulaires (DOREE *et al.* 1972, GRIGNON et LAMANT 1973, HELLER, GRIGNON et RONA 1974).

Je me suis adressé, pour mes essais, à des cultures de *Lemna minor* L., petites plantes aquatiques qui se reproduisent très rapidement par voie végétative, et dont il est facile d'obtenir ainsi des quantités abondantes, sur un même clône, en conditions aseptiques. Ce matériel présente sur les fragments de végétaux supérieurs envisagés ci-dessus, l'avantage d'être intact, et de se trouver, pour les expériences qui se font sur milieu liquide, dans des conditions normales de vie. Certes, c'est un matériel moins commode à utiliser qu' une suspension cellulaire, et avec lequel les résultats seront plus complexes à interpréter, mais il présente cependant certains avantages (relative homogénéité des prélèvements en particulier) et évite l'inconvénient d'avoir à travailler sur des cellules très perturbées par rapport aux cellules "normales" des tissus végétaux, comme le sont ces suspensions cellulaires.

Naturellement, ce matériel présente un certain nombre de difficultés : il est "épais", et il faut s'assurer de la signification des flux que l'on mesure, par des expériences préalables de compartimentation. Il intervient certainement des espaces libres, et même des espaces de DONNAN dans les parois, non négligeables. Il se superpose sans doute des processus de diffusion aux échanges catalysés. Enfin, l'évaluation des concentrations et des radioactivités spécifiques intérieures, ainsi que celle des différences de potentiel membranaire sera délicate. Nous discuterons de tout ceci au cours du texte. -

0

0 0

Dans le détail, le problème précis auquel je me suis intéressé est celui des échanges de potassium de la *Lemna*, en relation avec la teneur en alcalino-terreux (calcium et magnésium) dans le milieu. C'est en effet un problème qui présente une importance particulière pour l'équilibre de la nutrition des végétaux supérieurs ; et, les données de la bibliographie étant abondantes, certes, sur le sujet, mais encore assez confuses et contradictoires, je pouvais espérer apporter une certaine clarification en reprenant la discussion des mesures de flux et de forces selon une formulation purement macroscopique (thermodynamique) telle que la proposait THELLIER (1968).

Pour éviter des redites, ce mémoire de thèse sera présenté en deux tomes (présentation adoptée depuis peu par quelques chercheurs (cf. en particulier DOREE, 1973).

Dans le deuxième seront rassemblés, par ordre chronologique, les tirés à part des publications auxquelles ce travail a donné lieu. Dans le premier, je procèderai surtout à l'analyse et à la discussion d'ensemble de mon travail, en n'indiquant plus, comme résultats expérimentaux, que ceux qui n'ont pas encore été publiés, mais en me contentant de faire référence au deuxième tome pour tous les autres : ceci me permettra en particulier, pour cette analyse, d'abandonner l'ordre chronologique (qui procède parfois, inévitablement, par "essais et erreurs"...), et de suivre un enchaînement plus didactique de la présentation des idées.

Après deux paragraphes consacrés respectivement à l'historique (§ I) puis aux matériels et techniques (§ II), nous aborderons l'analyse de nos problèmes dans le cadre de la thermodynamique. Pour cela nous préciserons d'abord ce que sont les flux que nous envisageons par l'étude de la compartimentation (§ III), puis les forces par la contribution des différents termes (§ IV) ; nous appliquerons les relations flux/forces à l'interprétation des données expérimentales (§ V) ; enfin, nous reprendrons l'ensemble de la discussion dans un paragraphe de conclusions générales (§ VI).

I - HISTORIQUE

PROBLEME DES FLUX D'IONS ECHANGES PAR UN VEGETAL

I.1. ASPECT EXPERIMENTAL DES ETUDES CINETIQUES DE L'ABSORPTION

L'absorption des ions par les végétaux a souvent été étudiée grâce à des traceurs radioactifs et sur des systèmes en "déséquilibre" par rapport au milieu extérieur, c'est à dire dans des conditions où les flux nets ne sont pas nuls. L'expérience montre alors que si l'on suit la fixation d'un traceur par un végétal en fonction du temps, on obtient le plus souvent une courbe dont l'allure est décrite par la figure I.1.

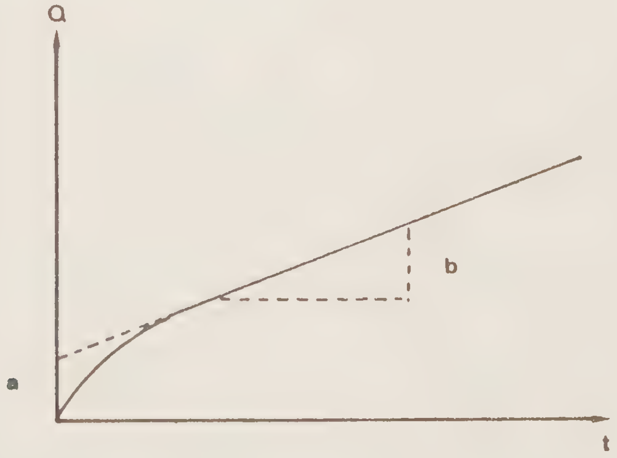

Fig. I.1. Accumulation d'un ion au cours du temps

a : ordonnée à l'origine (quantité d'ions contenue dans les "espaces libres")

b : pente : vitesse d'absorption

On admet généralement (STEWARD et HARRISON 1939) qu'une telle courbe est en fait la superposition de deux phénomènes :

- un phénomène rapide d'équilibration des espaces libres de l'échantillon avec le milieu extérieur ;

- un phénomène plus lent, correspondant à un état stationnaire initial de passage de l'ion vers l'intérieur des cellules (MACKLIS 1944, BUTLER 1953 a).

Une telle dualité de l'absorption est interprétée en relation avec la structure compartimentale (CRAM et LATIES 1971) où l'état stationnaire, permettant de définir une vitesse d'absorption cellulaire v, correspondrait à la traversée du plasmalemme.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la variation de v en fonction de la concentration de l'ion dans le milieu extérieur et l'on obtient soit une courbe monophasique (fig. I.2 a), soit une courbe diphasique (fig. I.2.b) ou même multiphasique dans le domaine des concentrations physiologiques ou relativement excessives.

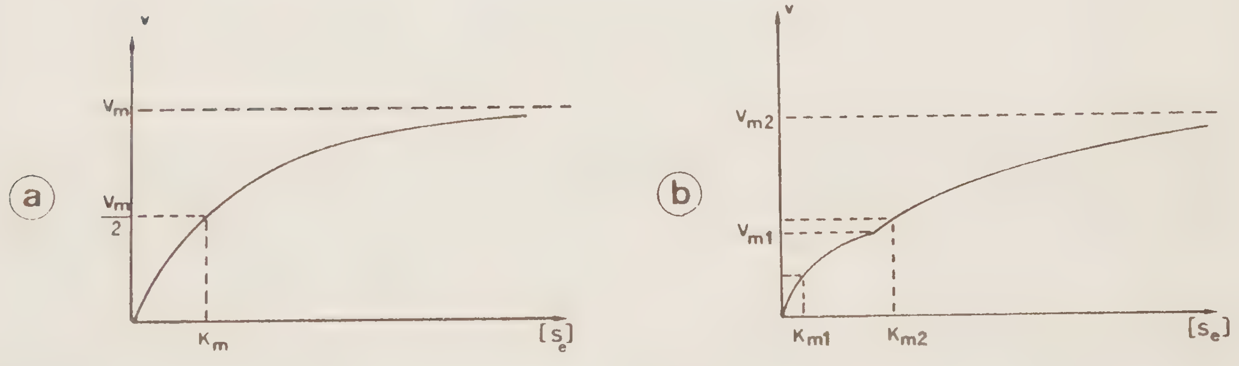

Fig. I.2. Absorption en fonction des doses

(a) courbe monophasique

(b) courbe diphasique interprétée par la superposition de deux mécanismes michaeliens ("Dual mechanism" d'EPSTEIN)

Le protocole expérimental suivi alors par la plupart des chercheurs, et en particulier par ceux de l'école d'EPSTEIN devait donc permettre de mesurer, de préférence sur un système carencé, ou dont la teneur naturelle en sels est faible ("low salt"), une vitesse initiale d'absorption (EPSTEIN et HAGEN 1952). A cet égard la racine d'orge excisée a constitué pendant plus de trente ans un matériel de choix pour les expérimentateurs.

Dans la conduite des mesures d'absorption, la plupart des auteurs admettent que la contribution des "espaces libres" est pratiquement éliminée par un lavage standardisé à l'eau froide, d'autant que l'emploi systématique de calcium, à faible dose dans le milieu, empêche le cation étudié d'être adsorbé sur les sites superficiels des cellules. Certains ont considéré que l'absorption des ions à travers le plasmalemme était pratiquement irréversible et que seuls les "espaces libres" pouvaient relarguer des ions vers l'extérieur (EPSTEIN et LEGGETT 1954, EPSTEIN 1955) : ceci aurait autorisé à confondre influx net et flux brut pour la pénétration cellulaire. Mais cette hypothèse fut contestée par la suite, surtout en ce qui concerne les cations monovalents (VALLEE 1963) ; et nous distinguerons le flux net et les flux bruts entrant et sortant.

I.2. FORMULATION CLASSIQUE DES MESURES DE FLUX

Pour parvenir à interpréter les courbes d'absorption d'un ion ainsi que les déformations qu'elles sont susceptibles de subir sous l'effet de divers facteurs (présence d'autres ions, température, pH, etc...), il est nécessaire d'utiliser un modèle théorique qui puisse introduire des paramètres permettant de caractériser les systèmes de transport.

Dans ce but, un effort théorique a été entrepris par de très nombreux chercheurs. Beaucoup ont tenté, pour cela, d'étendre, à ces phénomènes d'échanges transmembranaires, le formalisme de la cinétique enzymatique. Une présentation très rigoureuse de ce type de formulation a été donnée par KING et ALTMAN (1956), puis reprise et développée pour la microbiologie par WONG et HANES (cf. SCHASCHTER 1972) ; mais les premiers modèles "intuitifs" sont bien antérieurs (EPSTEIN et HAGEN 1952).

1.2.1. APPROCHE THEORIQUE DE KING ET ALTMAN (1956)

L'existence d'un transporteur C mobile et monovalent apte à catalyser le transfert d'un substrat S est postulée : la catalyse du transfert passe par la formation d'un complexe intermédiaire stéréospécifique auquel on doit pouvoir appliquer les lois de la cinétique chimique homogène.

Le transporteur peut s'associer avec la substance à transporter sur les deux faces de la membrane dans l'épaisseur de laquelle il peut diffuser à l'état libre ou combiné. On aurait d'après ces auteurs le schéma représenté par la figure I.3.

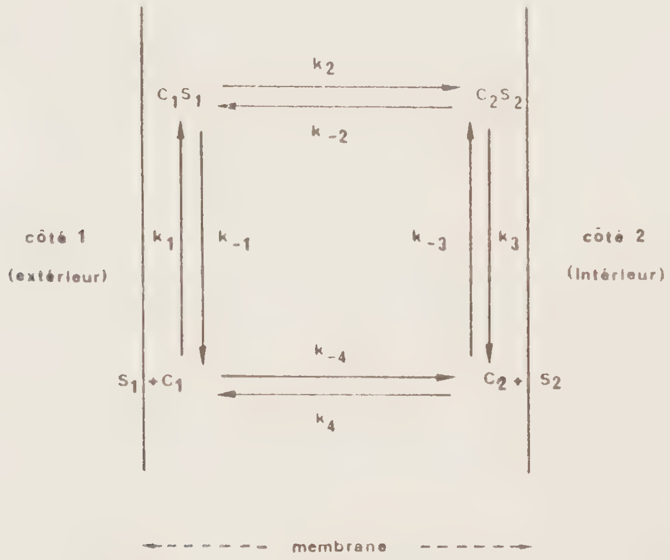

Fig. I.3. Le modèle cinétique homogène
(d'après KING et ALTMAN 1956)

Comme dans le cas de la cinétique enzymatique, le postulat de conservation et l'hypothèse de l'état stationnaire doivent pouvoir s'appliquer.

Dans le détail, ces auteurs posent, d'une part trois équations indépendantes traduisant l'état stationnaire :

$$\frac{dC_1}{dt} = -k_{-4}[C_1] - k_1[S_1][C_1] + k_4[C_2] + k_{-1}[S_1C_1] = 0 \quad (1)$$

$$\frac{dC_1S_1}{dt} = k_1[S_1][C_1] - (k_2 + k_{-1})[S_1C_1] + k_{-2}[S_2C_2] = 0 \quad (2)$$

$$\frac{dC_2S_2}{dt} = k_{-3}[S_2][C_2] + k_2[S_1C_1] - (k_{-2} + k_3)[S_2C_2] = 0 \quad (3)$$

d'autre part l'équation de conservation

$$[C_1] + [C_2] + [S_1C_1] + [S_2C_2] = [C_t] \qquad (4)$$

($|C_t|$ étant la concentration totale en transporteur) et, enfin, l'équation de vitesse nette

$$v = k_3[C_2S_2] - k_{-3}[S_2][C_2] \qquad (5)$$

$[C_2]$ et $[C_2S_2]$ sont calculées à partir des équations 1 à 4 par

$$x_n = \frac{D_n}{\Delta} \qquad (6)$$

où x symbolise les variables et n leur ordre dans les équations ($|C_2|$ correspond ainsi à x_2 et $|C_2S_2|$ à x_4), et où Δ est le déterminant du système et D_n les déterminants obtenus en remplaçant dans Δ la $n^{ième}$ colonne par la colonne des termes constants des équations 1 à 4.

Tous calculs faits, on obtient

$$v = |C_t| \frac{k_1k_2k_3k_4 [S_1] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} [S_2]}{\Delta} \qquad (7)$$

avec

$$\Delta = (k_4+k_{-4})(k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2} + k_2k_3) + k_1(k_2k_3 + k_3k_4 + k_{-2}k_{-4} + k_2k_4)[S_1] + k_{-3}(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{-4} + k_{-2}k_{-4} + k_2k_{-4}) [S_2] + k_1k_{-3}(k_2+ k_{-2}) [S_1][S_2]$$

1.2.2. HYPOTHESES SIMPLIFICATRICES

Le nombre important de paramètres mis en jeu dans l'expression précédente ne permet pas de formuler commodément les mesures de flux : d'où la nécessité d'introduire des hypothèses simplificatrices permettant de la rendre utilisable.

Ces simplifications aboutissent, dans le détail, à deux types d'équations, celle d'un transport actif et celle qui décrit la diffusion facilitée.

I.2.2.a Transport actif

Dans un tel cas, seule la constante de diffusion a la même valeur pour le transporteur libre ou complexé

$$k_2 = k_{-2} = k_4 = k_{-4} = k_D \qquad (8)$$

Dans ces conditions, l'équation (7) s'écrit

$$v = \frac{[C_t]k_D}{2}\left[\frac{[S_1]k_1/k_{-1}}{1+[S_1]k_1/k_{-1}} - \frac{[S_2]k_{-3}/k_3}{1+[S_2]k_{-3}/k_3}\right] \qquad (9)$$

soit en posant $k_{-1}/k_1 = k_e$

$k_3/k_{-3} = k_i$

$$v = \frac{[C_t]k_D}{2}\left[\frac{[S_1]/k_e}{1+[S_1]/k_e} - \frac{[S_2]/k_i}{1+[S_2]/k_i}\right] \qquad (10)$$

I.2.2.b Diffusion facilitée

Ce serait le cas obtenu lorsque l'on a en plus $k_e = k_i$ (même constante de dissociation du complexe sur les deux faces de la membrane).

On a alors :

$$v = \frac{[C_t]k_D}{2}\left[\frac{[S_1]/k}{1+[S_1]/k} - \frac{[S_2]/k}{1+[S_2]/k}\right] \qquad (11)$$

et, dans le cas particulier où l'équilibre correspond à l'égalisation des concentrations de part et d'autre de la membrane c'est à dire $[S_1] = [S_2]$, la vitesse s'annule.

Une telle équation ne s'applique donc que dans le cas de la diffusion facilitée (transport passif).

I.2.2.c Application des équations précédentes aux flux bruts initiaux : retour à l'équation michaelienne

Si l'on fait intervenir, non plus la vitesse nette mais la vitesse brute obtenue en conditions initiales, on a alors :

$[S_2] = 0$ et l'équation (10) devient

$$v = \frac{[C_t]k_D}{2} \cdot \frac{[S_1]/k_e}{1+[S_1]/k_e} \qquad (12)$$

en posant $k_e = k_m$ et $\frac{[C_t]k_D}{2} = V_m$, on obtient :

$$v = V_m \frac{[S_1]/k_m}{1+[S_1]/k_m} \qquad (13)$$

soit en définitive

$$v = \frac{V_m [S_1]}{k_m + [S_1]} \qquad (14)$$

Cette équation n'est autre que celle de MICHAELIS-MENTEN (1913) utilisée en cinétique enzymatique à un substrat.

En constatant que les distributions expérimentales de points, dans les essais d'absorption en fonction des doses, présentaient souvent une courbure négative, EPSTEIN et HAGEN avaient proposé dès 1952 d'utiliser la formule (14) pour décrire les échanges entre cellules et milieu extérieur.

Ainsi, ces auteurs admettent que les "transporteurs" (qui prélèvent le substrat du côté extérieur de la membrane et le libèrent de l'autre) obéissent, comme en enzymologie *in vitro*, aux lois de la cinétique classique.

Ceci conduit naturellement à attribuer à V_m la signification d'une vitesse à saturation du transporteur et à k_m , en première approximation, celle de l'inverse de l'affinité du transporteur pour son substrat S . Les deux paramètres fondamentaux de l'hyperbole permettent ainsi de résumer, dans le cas d'un processus d'absorption, l'information contenue dans la distribution des points expérimentaux.

I.3. APPLICATION A LA DESCRIPTION DES ECHANGES TRANSMEMBRANAIRES

L'utilisation d'un modèle hyperbolique entre la vitesse d'absorption d'un ion et sa concentration dans le milieu extérieur permet donc, par les paramètres k_m et V_m, de résumer l'information plus commodément qu'à partir de tableaux de valeurs expérimentales. De plus lorsque les points expérimentaux se disposent selon des distributions biphasiques ou multiphasiques, nombre d'auteurs admettent (EPSTEIN 1966, NISSEN 1973) qu'elles résultent d'une superposition de deux ou plusieurs mécanismes que l'on peut caractériser respectivement par (k_{m1}, V_{m1}), (k_{m2}, V_{m2}) etc... ; et ils attribuent à ces paramètres la signification moléculaire qu'on leur donne en enzymologie *in vitro*. Un tel modèle permettrait donc, à partir de mesures purement macroscopiques, non seulement de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre ions mais aussi de les classer et de les interpréter au niveau moléculaire : nombre de transporteurs d'après le nombre des arcs des courbes (NISSEN 1973), caractéristiques moléculaires du transporteur par les paramètres qui lissent au mieux ces arcs, interprétation de l'inhibition compétitive entre deux ions comme correspondant à l'existence d'un transporteur commun apte à catalyser le transfert de l'un et de l'autre de ces deux ions ...

Cette formulation parait donc attrayante ; et beaucoup d'auteurs l'ont utilisée ou continuent à le faire (HAGEN et HOPKINS 1955, BANGE 1959, ELZAM, RAINS et EPSTEIN 1964, CARTER et LATHWELL 1968, JEANJEAN 1974, VANGE *et al.* 1974 a).

Nous l'avions d'ailleurs appliquée dans nos premières publications sur les interactions halogénures-borate (cf. annexe 1), phosphate-borate (cf. annexe 2), et nous avons vérifié même sur des expériences plus récentes, à nombres de points expérimentaux plus élevés, que ces derniers sont assez bien lissés par deux hyperboles.

La figure I.4 a en donne un exemple ; et, l'application de la méthode de linéari-

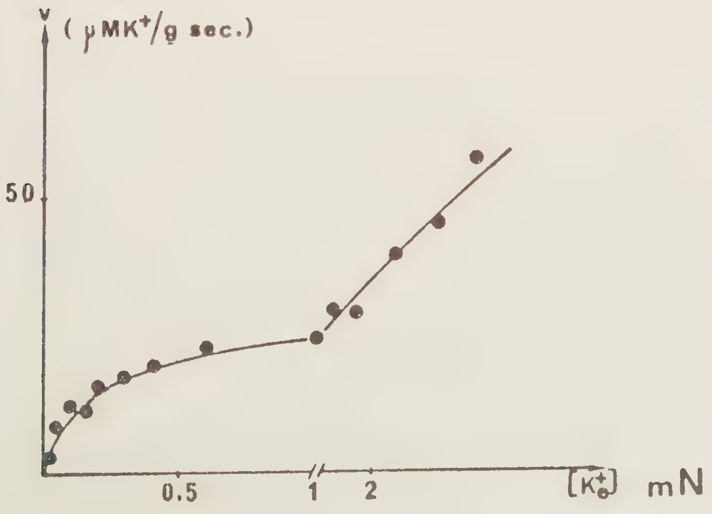

Fig. I.4 a

Absorption du potassium en fonction des doses : représentation en coordonnées directes de MICHAELIS-MENTEN

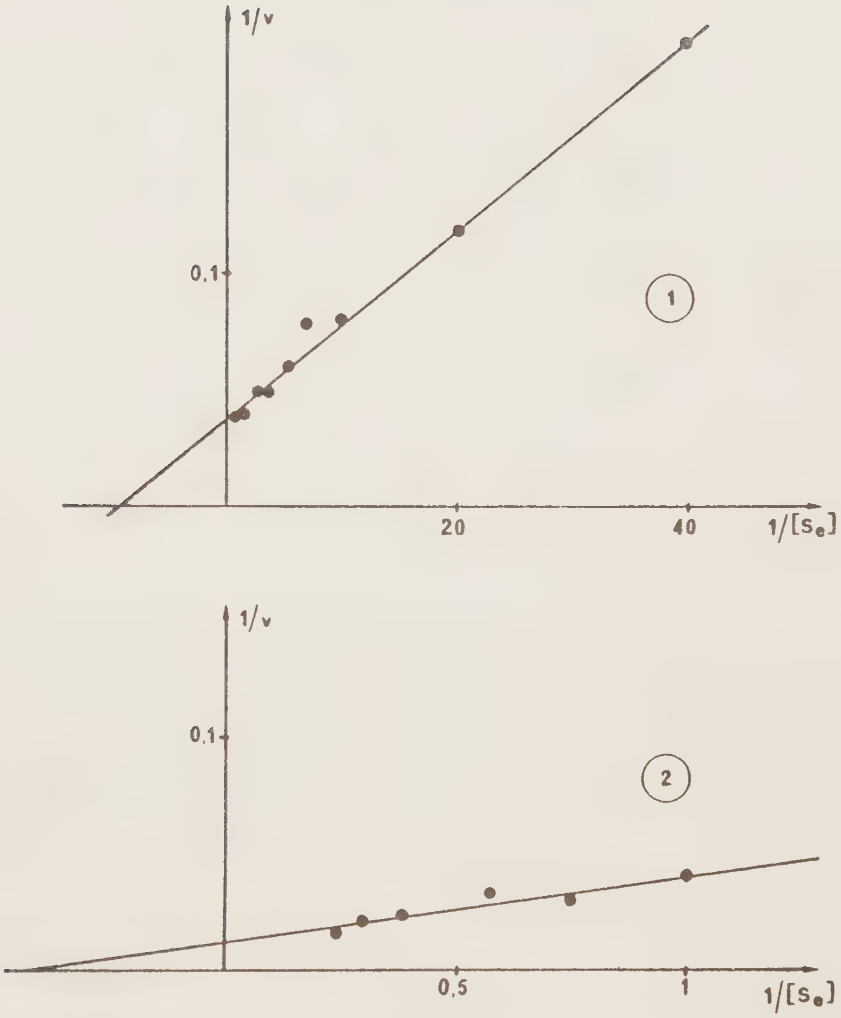

Fig. I.4.b Représentation en coordonnées inverses de LINEWEAVER et BURK

(1) 1ère hyperbole

(2) 2ème hyperbole

sation (fig. I.4.b) de LINEWEAVER et BURK (1934) permet d'atteindre, pour chacune d'entre elles, des valeurs de k_m et V_m (cf. Tableau I).

Tableau I

Valeurs des paramètres michaeliens

1ère hyperbole	$k_{m1} = 9.10^{-5} M$ $V_{m1} = 23$ µeq g $sec^{-1}h^{-1}$
2ème hyperbole	$k_{m2} = 220.10^{-5} M$ $V_{m2} = 78$ µeq g $sec^{-1}h^{-1}$

Nous verrons, toutefois, que cette formulation n'est pas exempte de graves difficultés, déjà préssenties à propos de l'absorption de l'ion phosphate par la *Lemna minor* (cf. annexe 3) et qui nous ont conduit à l'abandonner. Mais avant d'en arriver là, il convient de rappeler l'essentiel de ce que l'utilisation de cette théorie avait apporté au problème de l'absorption des alcalins et le rôle des alcalino-terreux avant que je n'essaie de l'aborder d'un autre point de vue.

I.4. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ETUDE DES FLUX D'IONS ALCALINS ET ROLE DES IONS ALCALINO-TERREUX, ET LEUR INTERPRETATION EN TERMES MICHAELIENS

I.4.1. POSITION DU PROBLEME

L'absorption des ions par les végétaux a été abordée sous de multiples aspects comme en témoigne l'abondance et la diversité des résultats obtenus. Ceci ne permet guère d'obtenir un inventaire complet des conclusions auxquelles sont parvenus les différents chercheurs.

Néanmoins, à travers les données bibliographiques un certain nombre de points peuvent être retenus car admis actuellement par la plupart des auteurs.

Ainsi, on sait depuis longtemps que, d'une façon générale, l'absorption d'un ion peut être stimulée ou inhibée par la présence d'autres ions (HOAGLAND 1928) et que la vitesse d'absorption d'un cation est fonction de celle de l'anion qui l'accompagne mais qu'elle est fonction inverse de sa valence (SUTCLIFFE 1962).

Dans le domaine des interactions, l'inhibition compétitive au sens d'EPSTEIN a été généralement observée pour des éléments appartenant au même groupe chimique : pour les alcalins, l'absorption du potassium est inhibée compétitivement par le sodium, par le rubidium (VALLEE 1963) ou même par des protons qui entrent en compétition pour les mêmes sites (RAINS, SCHMID et EPSTEIN 1964).

I.4.2. EFFET DES ALCALINO-TERREUX

Parmi les cations divalents c'est surtout le calcium qui a retenu l'attention des chercheurs. On pense qu'il interviendrait dans le maintien de l'intégrité et de la stabilité membranaire (GRUNWALD 1968 ; VAN STEVENINCK 1965), dans la perméabilité et la sélectivité (LEGGETT 1968), dans la protection contre les pH bas et les substances toxiques (RAINS, SCHMID et EPSTEIN 1964) ainsi que dans la régulation de l'absorption des ions (WAISEL 1962). Pour ce qui est des alcalins, leur absorption est toujours affectée par la présence d'ions alcalino-terreux dans le milieu extérieur (VIETS 1944 ; EPSTEIN 1966 ; HANDLEY, METWALLY et OVERSTREET 1965 ; HOOYMANS 1964 ; RAINS et EPSTEIN 1967, a et b). Mais les résultats obtenus sont souvent fragmentaires, confus et parfois même contradictoires, en particulier lorsqu'il s'agit de l'effet du calcium. Stimulant l'absorption du potassium pour les uns (JACOBSON, MOORE et HANNAPEL 1960 ; MARSCHNER, HANDLEY et OVERSTREET 1966), le calcium parait inhibiteur pour d'autres (HOOYMANS 1964 ; ELZAM et HODGES 1967).

Quoi qu'il en soit, il semble que l'effet observé dépende étroitement du matériel utilisé et des conditions d'expérience. En effet KAHN et HANSON (1957), travaillant sur le Soja et le Maïs déduisent de l'analyse cinétique des résultats que l'effet globalement constaté est en réalité la résultante de deux effets antagonistes, dont l'importance relative dépendrait de la nature de l'échantillon végétal et du domaine de concentrations utilisées. Ces mêmes auteurs ont observé que l'effet activateur domine aux faibles concentrations d'alcalins aussi bien dans le cas du blé que celui de l'avoine. Cet effet activateur serait lié au métabolisme (HANDLEY, METWALLY et OVERSTREET 1965).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le rôle du calcium sur le mouvement des cations monovalents. Toutes se réfèrent plus ou moins à la théorie des transporteurs "mobiles" : formation de complexe Ca-transporteurs pour le transfert de potassium, augmentation de l'affinité du transporteur pour son substrat (KAHN et HANSON 1957 ; TANADA 1962) etc... ou encore intervention au niveau d'ATPases particulières impliquées dans le transport des ions (FLORKIN et STOTZ 1965 ; KYLIN et KAHN 1973).

Quant au magnésium, il est souvent présenté comme inhibiteur de l'absorption des alcalins et à ce titre, il aurait un effet similaire à celui du calcium au niveau de la structure membranaire. Un fait important a été observé par BANGE *et al.* (1968) qui, étudiant les effets comparés du calcium et du magnésium sur l'absorption du sodium et du rubidium, avaient noté que si tous deux inhibent l'absorption du sodium, seul le calcium stimule celle du rubidium et que ce serait là probablement un effet spécifique en relation avec le métabolisme.

Toutes ces conclusions ont été déduites, rappelons-le, à partir de l'analyse cinétique de résultats exploités dans le formalisme michaelien, mais, pour diverses raisons théoriques que nous allons examiner maintenant, il n'est pas évident que ce formalisme soit toujours bien adapté au traitement des processus biologiques *in vivo* (THELLIER 1968).

I.5. DIFFICULTES THEORIQUES DES MODELES MECANISTIQUES (MICHAELIENS)

C'est un fait certain que, dans un domaine limité de concentrations, les courbes expérimentales sont souvent bien lissées par une hyperbole du type michaelien, traduisant ainsi une bonne cohérence avec le modèle théorique proposé. Mais ceci ne signifie pas, pour autant, que ce modèle est adapté au phénomène étudié.

En particulier le modèle d'EPSTEIN et HAGEN, avec tout le cortège d'hypothèses et postulats de l'enzymologie classique ne saurait s'appliquer au processus d'absorption transmembranaire qui se déroule, contrairement à une réaction enzymatique, dans un milieu particulièrement anisotrope et structuré. Le modèle de KING et ALTMAN introduit, certes, une amélioration en considérant que le processus est en fait la superposition de plusieurs processus élémentaires, mais il n'en reste pas moins vrai que l'anisotropie n'est pas prise en considération au niveau de la formulation locale du transfert.

Il est fort probable que les protéines de transfert ne soient pas disposées au hasard les unes par rapport aux autres et qu'elles n'aient pas, a priori, le comportement qu'elles pourraient avoir à l'état dissous, en milieu homogène et isotrope, comme pour la plus simple des réactions enzymatiques.

Ainsi, dans le cas d'un transfert d'ions, les paramètres K_m et V_m peuvent ne pas avoir la signification qu'on leur confère habituellement dans le cadre de la cinétique michaelienne qui suppose, en définitive, l'homogénéité, l'isotropie et l'absence de toutes sortes d'interactions spécifiques entre les éléments du milieu réactionnel.

On peut alors penser qu'il n'y a aucune raison, a priori, pour que la forme compliquée des courbes cinétiques, obtenues expérimentalement, corresponde à une

superposition de mécanismes simples (michaeliens) ; et il parait plus raisonnable d'admettre que cette complexité des courbes expérimentales ne fait que traduire le fait que le phénomène considéré est lui-même fondamentalement très complexe (interactions multiples, anisotropie, existence de très forts gradients, etc...).

En particulier, en admettant l'existence de protéines de transport à plusieurs sites présentant des interactions spécifiques, DUCET (1973) parvient à construire un modèle théorique cohérent avec bon nombre de résultats expérimentaux, ce qui permet d'affiner la description du processus de transfert.

Mais la cohérence constatée entre ces divers modèles et les résultats expérimentaux ne permet pas pour autant, de lever la difficulté théorique fondamentale qui consiste à effectuer le passage du niveau macroscopique au niveau microscopique ; car, en fait, des mesures purement macroscopiques (flux, concentrations, etc...) ne permettent pas, en général, d'atteindre des renseignements moléculaires. La théorie montre, en effet, que, chaque fois que l'on a affaire à un système structuré et n'obéissant pas à la statistique de BOLTZMANN, on ne peut espérer parvenir, sauf dans un certain nombre de cas relativement simples (réseaux cristallins, etc...), à effectuer le passage d'un niveau à l'autre.

I.6. LES MODELES "MACROSCOPIQUES"

Toutes ces difficultés ont conduit un certain nombre de chercheurs à élaborer d'autres formalismes que l'on essaie d'appliquer, avec plus ou moins de succès, aux mécanismes de transfert transmembranaire.

Les plus connus sont, d'une part, ceux qui dérivent de la théorie d'EYRING (GLASSTONE, LAIDER et EYRING 1941) et, d'autre part, ceux de la thermodynamique des processus irréversibles. Ces derniers, purement macroscopiques, essaient de relier des grandeurs mesurables (flux, concentrations, ...) par des paramètres descriptifs du fonctionnement des systèmes de transfert, sans faire appel à des hypothèses sur la nature intime de ces systèmes.

Nous n'exposerons ici que la formulation thermodynamique, dite "électrocinétique" proposée par THELLIER en 1968 et que nous avons largement utilisée pour interpréter nos essais d'interactions d'ions alcalins et alcalino-terreux lors de l'absorption des premiers par la *Lemna minor*.

I.7. LA FORMULATION "ELECTROCINETIQUE"

I.7.1. APPROCHE THERMODYNAMIQUE

La thermodynamique des processus irréversibles considère qu'au voisinage de l'équilibre thermodynamique d'un système, chaque flux J est relié aux forces X par une combinaison linéaire du type

$$J_i = \sum_j L_{ij} X_j \qquad (15)$$

Cette relation constitue en fait un modèle analytique utilisable tant que l'on n'est pas loin des conditions d'équilibre et applicable aux transferts transmembranaires indépendemment de l'aspect moléculaire du mécanisme assurant ces transferts.

I.7.2. DESCRIPTION DU MODELE ELECTROCINETIQUE

Partant de ces considérations, le modèle électrocinétique considère la vitesse d'échange d'un ion entre un système vivant et le milieu extérieur comme un cas particulier d'un courant qui se produit sous l'effet de forces extérieures (concentration, etc...) et intérieures aux cellules (activité interne des ions, couplage à des réactions métaboliques, etc...).

Le problème du transfert sera donc traité en utilisant la relation "courant-force" de la thermodynamique des processus irréversibles.

Dans les conditions stationnaires initiales, seule la contribution des forces externes reste la variable caractéristique du processus d'absorption et, si l'on travaille à des concentrations $[S]$ variables on suppose, en première approximation, (THELLIER 1968) que, dans le domaine proche de l'équilibre thermodynamique, le courant, donc la vitesse d'absorption, est proportionnel à $\log [S]$ si bien que l'on a une relation linéaire du type

$$v = L \log (\pi [S]) \qquad (16)$$

où L est un paramètre extensif, caractéristique de l'édifice catalytique de l'absorption de l'ion S et π un paramètre de force qui résume les conditions internes de la cellule.

Plus loin de l'équilibre, il s'introduit dans la relation "courant-

-force" des termes non linéaires pour lesquels on peut essayer une forme du type

$$v = (\lambda \log (\pi [S])^{m} \quad (17)$$

avec deux nouveaux paramètres (λ et m) dont la signification sera précisée plus loin.

Ceci conduit finalement à l'équation

$$v = L \log (\pi [S]) + (\lambda \log (\pi [S])^{m} \quad (18)$$

expression dans laquelle le second terme tend bien vers 0 plus vite que le premier quand $\pi [S]$ tend vers 1 c'est à dire quand on se trouve près de l'équilibre.

Enfin, on peut s'attendre, lorsque l'on étudie l'absorption à température variable, à trouver une relation entre L et la température de la forme :

$$L = L_o \, e^{-\frac{\varepsilon}{k}\frac{1}{T}} \quad (19)$$

qui introduit un paramètre (ε) intensif donc, caractérisant les systèmes catalytiques du point de vue de la <u>structure</u> (THELLIER 1970 ; THOIRON, THOIRON et THELLIER 1969).

Naturellement, ce modèle théorique étant purement macroscopique, les paramètres qu'il introduit ne peuvent avoir une signification moléculaire. Mais on peut leur trouver, comme on le verra plus loin, une signification biologique liée à leur caractère extensif ou intensif.

I.7.3. APPLICATION DU MODELE A LA DESCRIPTION DES INTERACTIONS IONIQUES

I.7.3.a Modification de π

Une perturbation qui modifie seulement π est une perturbation qui touche aux forces jouant sur l'échange d'ions, mais pas aux édifices catalytiques qui permettent la réalisation effective de cet échange. L'exemple le plus simple est celui de l'interaction compétitive qui modifie la

vitesse d'absorption v en v' par modification de π en π'.

En effet, sur le domaine des faibles concentrations, le taux d'interactions s'écrit :

$$\frac{v'}{v} = \rho = \frac{\log (\pi' [S])}{\log (\pi [S])} \qquad (20)$$

qui tend bien vers 1 quand $[S]$ augmente suffisamment (MONNIER et THELLIER 1970) de la même façon que le rapport

$$\sigma = \frac{K_m + [S]}{K'_m + [S]} \qquad (21)$$

dans le formalisme michaelien. L'inhibition peut être levée, dans les deux cas, par augmentation de $[S]$ de façon que $\log \pi$ (ou K'_m) devienne négligeable devant $\log [S]$ (ou S).

I.7.3.b Modification de L

Une interaction qui modifie L est une interaction qui affecte les édifices catalytiques de l'absorption eux-mêmes ; si la modification de L s'accompagne d'un changement de ε , c'est que la structure même de ces édifices est modifiée, sinon c'est qu'il s'agit d'une modification purement quantitative.

Notons enfin que sur la zone non linéaire, les modifications éventuelles des paramètres λ et m auront une signification un peu équivalente respectivement à celles de L et de ε sur la zone ohmique (THELLIER 1973).

I.7.4. EXTENSION DU FORMALISME

Nous avons vu que la relation (15)

$$J_i = \sum_j L_{ij} X_j$$

applicable dans les conditions proches de l'équilibre thermodynamique, traduit en fait l'existence d'un domaine linéaire. Ainsi, si l'on considère des processus fonctionnant en conditions stationnaires et proches de l'équilibre, on montre (ONSAGER 1931) que le courant (ou flux) de chacun de ces processus dépend de toutes les forces en présence dans le système. De plus, la matrice L_{ij} est symétrique (théorème d'ONSAGER). On a donc

$$L_{ij} = L_{ji} \qquad i \text{ et } j \quad (i \neq j) \tag{22}$$

Ce théorème doit pouvoir être testé dans le cas de notre formalisme, sur le domaine proche de l'équilibre. En effet si l'on a affaire à deux processus (1 et 2) fonctionnant en conditions stationnaires et proches de l'équilibre et dont l'évolution (v_1 et v_2) ne dépend, en première approximation que des seuls potentiels électrochimiques (c'est à dire en l'absence de toute autre force associée à d'éventuelles réactions de couplage métabolique), on peut écrire, dans le cas le plus simple, les équations

$$v_1 = L_{11} \log(\pi_1[S_1]) + L_{12} \log(\pi_2[S_2]) \tag{23}$$

$$v_2 = L_{21} \log(\pi_1[S_1]) + L_{22} \log(\pi_2[S_2]) \tag{24}$$

tout à fait analogues à

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2 \tag{25}$$

$$J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2 \tag{26}$$

et l'on doit retrouver, ici, l'équation (22) qui devient, dans le cas particulier

$$L_{12} = L_{21} \tag{27}$$

II - MATERIEL ET TECHNIQUES

Les particularités techniques introduites lors de certains types d'essais seront exposées en cours de texte. Je n'indiquerai donc ici que les conditions de culture d'entretien du matériel végétal, le cadre général d'expérience et les principales techniques utilisées pour l'exploitation des résultats.

II.1. MATERIEL ET CONDITIONS DE CULTURE

Les essais ont tous été effectués sur un clône de *Lemna minor* L. repiquées et cultivées aseptiquement, selon la méthode habituelle (HILLMAN 1961). Les cultures aseptiques sont maintenues en conditions, aussi constantes que possible, de température et d'éclairement continu (20°C, 4 000 Lux). Le spectre de cet éclairement est celui représenté en pointillé sur la figure II.1. Les *Lemna* sont utilisées au bout de trois semaines de culture.

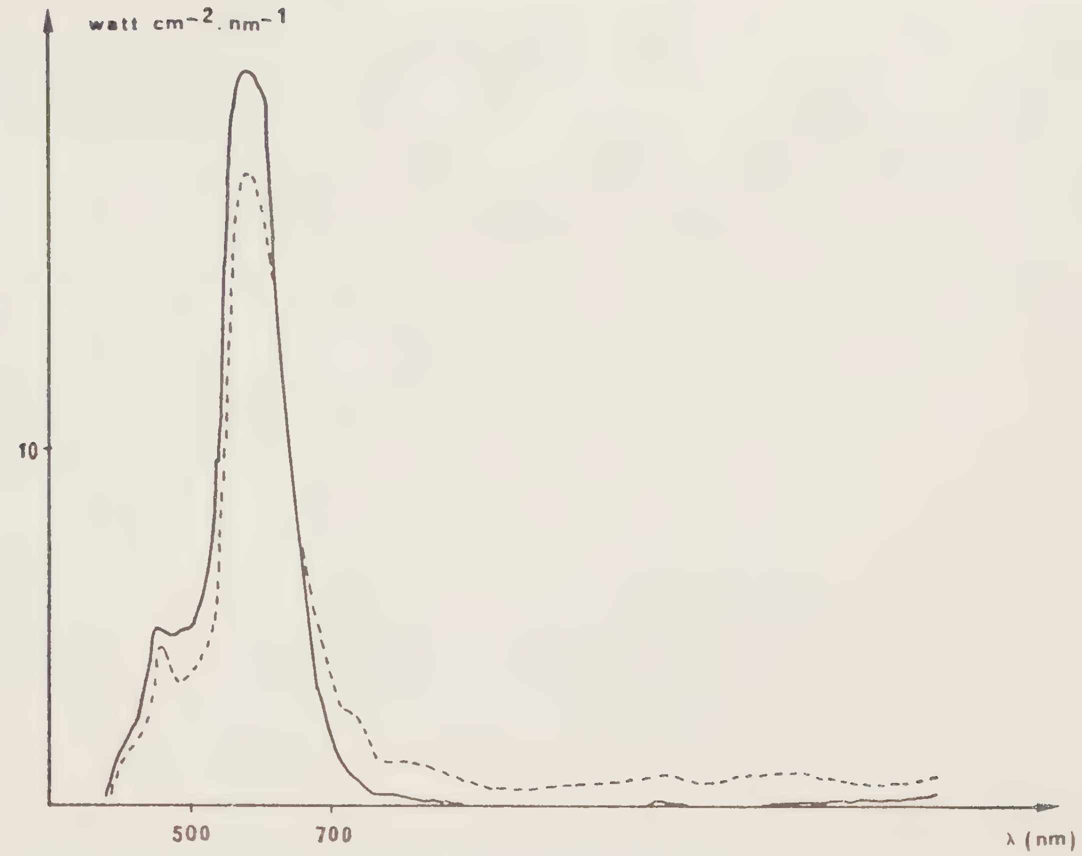

Fig. II.1 Comparaison des spectres d'éclairement

------- en conditions de culture

——— dans l'étuve où sont réalisées les expériences

II.2. CADRE GENERAL D'EXPERIENCE

L'absorption du potassium ou du rubidium, toujours apportés sous forme de chlorure, fut étudiée sur des solutions de concentrations généralement comprises entre 0,01 et 20 mN. Les ions alcalino-terreux (Mg^{++} ou Ca^{++}), éventuellement ajoutés aux milieux d'absorption, furent également apportés sous forme de chlorure.

Contrairement à certains auteurs (PITMAN, LUTTGE, CRAMER et BALL 1974) qui utilisent, pour plus de commodité, le ^{86}Rb pour tracer le potassium, nous avons préféré, quant à nous, marquer toujours le potassium et le rubidium respectivement par leurs isotopes ^{42}K et ^{86}Rb, ces deux éléments n'ayant pas nécessairement le même comportement du point de vue de l'absorption (MAAS et LEGGETT 1968 ; MARSCHNER et SCHIMANSKI 1971). Dans certains essais nous avons été conduits à marquer simultanément le chlore (au ^{36}Cl) et le potassium. Tous ces radioisotopes étaient fournis par le Commissariat à l'Energie Atomique. De plus, chaque fois

que cela était nécessaire, nous avons tenu compte, dans l'évaluation des concentrations essayées, de la quantité d'entraineur éventuellement apportée lors du marquage des milieux.

Les pH des solutions d'absorption ont été relativement constants et compris entre 5 et 5,5 sur toute la gamme des concentrations essayées.

II.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

II.3.1. CAS DE L'ABSORPTION

Pour les expériences d'absorption, les milieux, diversement concentrés en les éléments minéraux étudiés, sont placés dans une étuve où la température et l'éclairement sont pratiquement contrôlés. Le spectre, en trait plein, de la figure II.1. représente l'énergie des radiations reçues par les plantes en cours d'expérience et il est intéressant de noter que ce spectre se superpose, dans une large mesure, à celui réalisé pendant la durée de la culture.

En début d'expérience, les *Lemna*, ayant préalablement séjourné 24 h sur de l'eau distillée, sont rincées et rapidement essorées avant d'être placées sur ces différents milieux. A des intervalles de temps réguliers, des prélèvements d'échantillons végétaux sont effectués sur ces milieux, rincés rapidement sur verre fritté, désséchés à 110°C et pesés. Après mesure de leur radioactivité, on peut ainsi obtenir les quantités d'ions fixés, en divisant ces valeurs d'activité (corrigées si nécessaire de la décroissance) par l'activité spécifique des milieux, déterminée dans une expérience préliminaire. Naturellement, cette façon de faire néglige l'erreur de réexsorption de la radioactivité dont on peut craindre l'intervention. Mais nous verrons plus loin que, dans nos conditions expérimentales, cette erreur reste effectivement négligeable.

Nos cinétiques en fonction du temps présentent, après une courte phase d'équilibration, une partie rectiligne permettant, en s'aidant de la loi des moindres carrés, d'évaluer une vitesse stationnaire initiale d'absorption, v , dans les différentes conditions expérimentales.

II.3.2. CAS DE LA COMPARTIMENTATION

II.3.2.a Conditions d'expérience

La méthode utilisée ici est celle préconisée par Mac ROBBIE et DAINTY (cf. GRIGNON 1974) et particulièrement utilisée et rediscutée par ce dernier et par HELLER (1974). Elle consiste à conduire l'exsorption contre un milieu de même composition que celle du milieu de charge. Une telle méthode permet, d'une part de se placer en régime d'équilibre (ce qui est commode pour le traitement mathématique du problème de l'efflux) et, d'autre part, de maintenir, pendant toute la durée de l'essai, l'échantillon végétal dans un état

physiologique normal.

L'échantillon, une fois chargé en traceur radioactif, est très rapidement essoré afin d'éliminer la radioactivité superficielle, puis mis à exsorber au temps $t = 0$ à partir duquel on suit l'évolution de l'efflux par l'apparition de radioactivité dans le milieu extérieur au cours du temps.

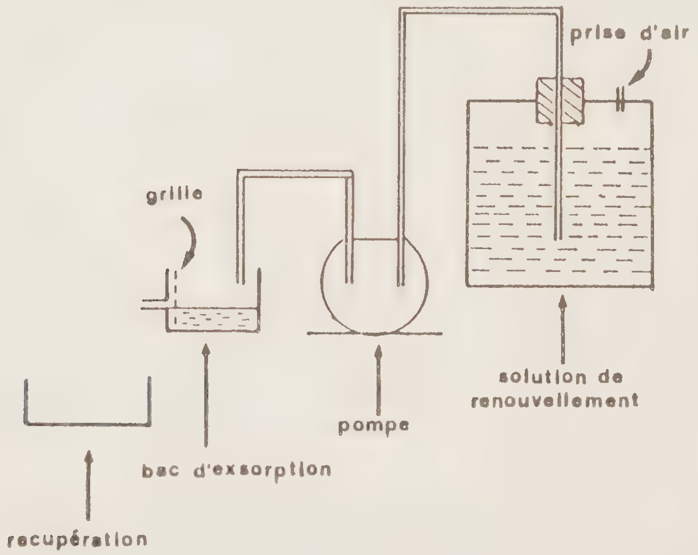

Fig. II.2. Schéma du montage réalisé pour l'étude d'une cinétique d'efflux

Des essais préliminaires ayant montré la nécessité d'un renouvellement fréquent de la solution externe pour éviter le phénomène de réabsorption du radioisotope, nous avons été conduits à mettre au point un système de renouvellement continu (fig. II.2.) à l'aide d'une pompe péristaltique assurant un débit constant (5l/h), dans un bac d'exsorption retenant en permanence 50 ml de solution. Dans ces conditions le $t\ 1/2$ (temps nécessaire pour renouveler la moitié du contenu) est alors de

$$t_{1/2} = \frac{3\ 600 \times 25}{5\ 000} \simeq 20 \text{ secondes}$$

II.3.2.b Technique de mesures

La technique de mesure consiste à recueillir pendant exactement 10 secondes, le liquide chargé en radioactivité à la sortie d'un trop plein monté au niveau du bac d'exsorption. La radioactivité exsorbée représente la vitesse instantanée v_i de l'efflux. Les mesures, très rapprochées en début d'expérience, sont ensuite de plus en plus espacées dans le temps. L'activité totale exsorbée au temps t est obtenue en intégrant la fonction définie par $v_i = f(t)$.

II.4. MESURES DE RADIOACTIVITE

La plupart des mesures de radioactivité ont été effectuées au compteur Geiger-Müller (compteur à circulation gazeuse type Saphymo). Mais pour les essais relativement récents et en particulier ceux réalisés sur l'efflux d'ions, les activités ont été mesurées au compteur à scintillation liquide (Intertechnique SL 40 IK) ou solide (Gammatic SAIP).

Je n'insisterai pas sur les conditions de mesure au compteur Geiger--Müller, bien connues et décrites dans ma thèse de 3ème cycle (1969). Mais quelques précisions seront données sur les mesures en scintillation.

II.4.1. MESURES EN SCINTILLATION LIQUIDE

L'énergie β^- du ^{42}K et du ^{86}Rb étant respectivement de 3,6 et 1,8 Mev, la mesure des échantillons liquides correspondant à ces deux isotopes a toujours été déterminée en se servant de l'effet Cevenkov. Par contre, avant d'être soumis à la mesure, les échantillons végétaux ont été préalablement détruits par l'acide nitrique à 32,5 % pendant 1 heure à 80°C puis mis en suspension dans 10 ml d'eau. L'eau, l'acide nitrique et la coloration propre des échantillons provoquent des affaiblissements lumineux. Pour éviter les ambiguités, nous conserverons, dans la suite, le nom anglais de "Quenching" pour caractériser l'erreur qui en résulte car il parait maintenant communément utilisé par tous les chercheurs.

Pour corriger le "Quenching" la méthode utilisée, ici, est celle du rapport des canaux (B/C). Son principe consiste à réaliser une série d'échantillons renfermant une même radioactivité (connue) et des quantités variables de l'agent d'extinction ("quencheur").

On détermine alors, pour chaque échantillon, la valeur du rapport R des radioactivités mesurées dans les canaux B et C convenablement réglés et l'efficacité E de comptage. On établit ainsi une courbe de correction $E = f(R)$ dont les paramètres, déterminés par une technique appropriée, sont introduits dans le calculateur de l'appareil ; ceci permet d'effectuer automatiquement la correction.

Dans le cas du ^{36}Cl dont l'énergie β^- est faible (0,7 Mev) nous avons utilisé un mélange scintillant (Insta-gel 6002173 fourni par Packard) pouvant tolérer un pourcentage d'eau relativement important (jusqu'à 40 à 50 %).

Les mesures ont été faites avec correction de "Quenching" obtenue par la méthode dite de l'"étalonnage externe" selon la technique habituelle.

II.4.2. MESURES EN SCINTILLATION SOLIDE

Elle a sourtout été utilisée pour mesurer la radioactivité du ^{42}K lorsque celui-ci se trouvait en présence de chlore radioactif également à mesurer.

Le chlore n'étant pas un émetteur γ, le dosage du ^{42}K, en sa présence, a pu être effectué à l'aide d'un passeur automatique (type gammatic PE 200/2B) réglé sur le seul pic γ du ^{42}K d'énergie 1,52 Mev.

Après disparition complète du ^{42}K par décroissance (environ une dizaine de jours) les échantillons sont repris et traités pour mesurer les activités du ^{36}Cl, en scintillation liquide selon la méthode décrite ci-dessus.

II.5. DOSAGE DU POTASSIUM ET DU RUBIDIUM PAR SPECTROGRAPHIE DE FLAMME

Ce dosage a été effectué au moyen d'un photomètre de flamme, type Eppendorf.

Si le dosage du potassium ne présente aucune difficulté en raison de l'absence d'interférence directe provenant éventuellement d'autres ions, celui du rubidium présente, par contre, l'inconvénient d'être géné par l'interférence directe due particulièrement au potassium inévitablement présent dans nos échantillons.

Cette difficulté a pu être surmontée en procédant, dans une première étape, à un dosage du potassium dans nos échantillons. Le rubidium est ensuite dosé en réglant le zéro, non plus sur de l'eau distillée, mais sur une solution contenant du potassium au même titre que dans l'essai. C'est également à partir de cette solution, dite de "compensation" qu'ont été réalisées les gammes d'étalonnage de l'appareil.

III - SIGNIFICATION DES FLUX

Les flux que nous avons utilisés dans notre formulation thermodynamique sont des flux obtenus en conditions stationnaires initiales d'absorption. Mais leur signification exacte, en relation avec la compartimentation cellulaire de nos échantillons demandait à être précisée. Pour cela, nous avons procédé à des cinétiques d'efflux (plus commodes pour atteindre la structure compartimentale) sur des plantes maintenues en conditions d'équilibre et préchargées en radio-isotopes (cf. Techniques p. 25).

Nous avons utilisé, pour cela, les méthodes classiques d'analyse des flux (ATKINS 1973) en nous inspirant tout particulièrement du travail effectué par le groupe d'HELLER (HELLER, GRIGNON et SCHEIDECKER 1973 ; GRIGNON 1974 ; HELLER 1974) sur les suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus*.

III.1. HYPOTHESES FONDAMENTALES

Faisons l'hypothèse que le système est, en première approximation, composé de trois compartiments disposés en série (parois, cytoplasmes, vacuoles). En réalisant les conditions expérimentales décrites plus haut (cf. Techniques p. 25), nous pouvons considérer que nous sommes en présence d'un système ouvert dont on mesure l'échange isotopique de l'ion étudié contre un milieu extérieur où l'activité spécifique S_o est maintenue, grâce au renouvellement continu, constamment nulle.

III.2. MISE EN EQUATION DU PROBLEME

Le tableau II résume les caractéristiques à l'instant $t = 0$

Tableau II

Les caractéristiques du système

Compartiments	(0) Extérieur	(1) Paroi	(2) Cytoplasme	(3) Vacuole	Conditions
Teneur en isotope stable		Q_1	Q_2	Q_3	
Teneur en traceur	0	$Q_1^{*}(t)$	$Q_2^{*}(t)$	$Q_3^{*}(t)$	
Activité spécifique	$S_0 = 0$	$S_1(t)$	$S_2(t)$	$S_3(t)$	
Flux isotopes stables	Φ_{01} → ← Φ_{10}	Φ_{12} k_{12} → ← k_{21} Φ_{21}	Φ_{23} k_{23} → ← k_{32} Φ_{32}		$\frac{d}{dt}\Phi_{ij}=0$ $\Phi_{ij}=\Phi_{ji}$

Pour un compartiment quelconque, nous avons

$$\frac{dQ_i^{*}}{dt} = \sum_j \Phi_{ji} S_j - \sum_j \Phi_{ij} S_i$$

$$\frac{dQ_i^{*}}{dt} = \sum_j \Phi_{ji} \frac{Q_j^{*}}{Q_j} - \sum_j \Phi_{ij} \frac{Q_i^{*}}{Q_i}$$

Dans le cas particulier où S_0 est nul et en l'absence de tout flux entre compartiments non adjacents (flux nuls entre compartiments 1 et 3), nous pouvons écrire

$$\frac{dQ_1^*}{dt} = -(\Phi_{10} + \Phi_{12}) \frac{Q_1^*}{Q_1} + \Phi_{21} \frac{Q_2^*}{Q_2}$$

$$\frac{dQ_2^*}{dt} = \Phi_{12} \frac{Q_1^*}{Q_1} - (\Phi_{21} + \Phi_{23}) \frac{Q_2^*}{Q_2} + \Phi_{32} \frac{Q_3^*}{Q_3}$$

$$\frac{dQ_3^*}{dt} = \Phi_{23} \frac{Q_2^*}{Q_2} - \Phi_{32} \frac{Q_3^*}{Q_3}$$

Si Q_1 est négligeable devant $Q_2 + Q_3$ et si Φ_{10} et Φ_{01} sont suffisamment supérieurs aux autres flux, on a

$$\frac{dQ_1^*}{dt} << 0 \qquad \text{donc} \quad Q_1^* \text{ tend vite vers } 0$$

Après les premiers instants, on peut assimiler les compartiments 0 et 1 à un compartiment unique, ce qui simplifie le système qui sera alors décrit par les équations :

$$\frac{dQ_2^*}{dt} = - \frac{\Phi_{21} + \Phi_{23}}{Q_2} Q_2^* + \frac{\Phi_{32}}{Q_3} Q_3^*$$

$$\frac{dQ_3^*}{dt} = \frac{\Phi_{23}}{Q_2} Q_2^* - \frac{\Phi_{32}}{Q_3} Q_3^*$$

III.3. RESOLUTION DU SYSTEME D'EQUATIONS

III.3.1. PRINCIPE

On transforme le système d'équations différentielles linéaires en système linéaire algébrique en utilisant la transformation de LAPLACE-CARSON (cf. SALLES 1961).

$$y\,F_2\,(y) - yQ_2^{\star}\,(0) = -\frac{\Phi_{21} + \Phi_{23}}{Q_2}\,F_2\,(y) + \frac{\Phi_{32}}{Q_3}\,F_3\,(y)$$

$$y\,F_3\,(y) - yQ_3^{\star}\,(0) = \frac{\Phi_{23}}{Q_2}\,F_2\,(y) - \frac{\Phi_{32}}{Q_3}\,F_3\,(y)$$

III.3.2. UTILISATION DE LA TRANSFORMEE DE LAPLACE-CARSON

$$F_2\,(y)\left(y + \frac{\Phi_{21} + \Phi_{23}}{Q_2}\right) - F_3\,(y)\,.\,\frac{\Phi_{32}}{Q_3} = y\,Q_2^{\star}\,(0)$$

$$F_2\,(y)\left(-\frac{\Phi_{23}}{Q_2}\right) + F_3\,(y)\left(y + \frac{\Phi_{32}}{Q_3}\right) = y\,Q_3^{\star}\,(0)$$

$$\Delta = \begin{vmatrix} y + \dfrac{\Phi_{21} + \Phi_{23}}{Q_2} & -\dfrac{\Phi_{32}}{Q_3} \\ -\dfrac{\Phi_{23}}{Q_2} & y + \dfrac{\Phi_{32}}{Q_3} \end{vmatrix}$$

soit

$$\Delta = y^2 + y\left(\frac{\Phi_{32}}{Q_3} + \frac{\Phi_{21}}{Q_2} + \frac{\Phi_{23}}{Q_2}\right) + \frac{\Phi_{21}\Phi_{32}}{Q_2 Q_3}$$

Le déterminant associé pour $F_2(y)$ est

$$N_2 = \begin{vmatrix} y\, Q_2^{\star}(0) & -\dfrac{\Phi_{32}}{Q_3} \\ y\, Q_3^{\star}(0) & y + \dfrac{\Phi_{32}}{Q_3} \end{vmatrix}$$

soit

$$N_2 = y^2 Q_2^{\star}(0) + y\left(Q_2^{\star}(0)\frac{\Phi_{32}}{Q_3} + Q_3^{\star}(0)\frac{\Phi_{32}}{Q_3}\right)$$

De la même façon, pour $F_3(y)$ nous aurons

$$N_3 = \begin{vmatrix} y + \dfrac{\Phi_{21} + \Phi_{23}}{Q_2} & y\, Q_2^{\star}(0) \\ -\dfrac{\Phi_{23}}{Q_2} & y\, Q_3^{\star}(0) \end{vmatrix}$$

soit

$$N_3 = y^2 Q_3^{\star}(0) + y\left(\frac{\Phi_{21} Q_3^{\star}(0)}{Q_2} + \frac{\Phi_{23} Q_3^{\star}(0)}{Q_2} + \frac{\Phi_{23} Q_2^{\star}(0)}{Q_2}\right)$$

Si $-\lambda_a$ et $-\lambda_b$ sont les deux racines de Δ, on peut écrire

$$\Delta = (y + \lambda_a)(y + \lambda_b)$$

avec

$$\lambda_a + \lambda_b = \frac{\Phi_{32}}{Q_3} + \frac{\Phi_{21}}{Q_2} + \frac{\Phi_{23}}{Q_2}$$

et

$$\lambda_a \lambda_b = \frac{\Phi_{21}\Phi_{32}}{Q_2 Q_3}$$

Posons

$$N_2 = y(\alpha y + \beta)$$

$$N_3 = y(\gamma y + \delta)$$

avec

$$\alpha = Q_2^{\star}(0)$$

$$\beta = \frac{\Phi_{32}}{Q_3}\left(Q_2^{\star}(0) + Q_3^{\star}(0)\right)$$

$$\gamma = Q_3^{\star}(0)$$

$$\delta = \frac{Q_3^{\star}(0)}{Q_2}(\Phi_{21} + \Phi_{23}) + \frac{Q_2^{\star}(0)}{Q_2}\,\Phi_{23}$$

Les équations $F_2(y)$ et $F_3(y)$ deviennent

$$F_2(y) = \frac{y(\alpha y + \beta)}{(y + \lambda_a)\ (y + \lambda_b)}$$

$$F_3(y) = \frac{y(\gamma y + \delta)}{(y + \lambda_a)\ (y + \lambda_b)}$$

III.3.3. TRANSFORMATION RETOUR

La fonction $f_i(t)$ cherchée est de la forme

$$f_i(t) = \rho_i e^{-\lambda_a t} + \sigma_i e^{-\lambda_b t}$$

$$F_i(y) = y \int_0^{+\infty} e^{-yt} f_i(t)\, dt$$

$$F_i(y) = y \int_0^{+\infty} \left(\rho_i e^{-(y + \lambda_a)t} + \sigma_i e^{-(y + \lambda_b)t} \right) dt$$

$$F_i(y) = y \left[- \frac{\rho_i}{y + \lambda_a} e^{-(y + \lambda_a)t} \right]_0^{\infty} + y \left[- \frac{\sigma_i}{y + \lambda_b} e^{-(y + \lambda_b)t} \right]_0^{\infty}$$

$$F_i(y) = \frac{\rho_i y}{y + \lambda_a} + \frac{\sigma_i y}{y + \lambda_b}$$

$$F_i(y) = \frac{y^2(\rho_i + \sigma_i) + y(\sigma_i\lambda_a + \rho_i\lambda_b)}{(y + \lambda_a)\quad(y + \lambda_b)}$$

$$F_i(y) = \frac{y\,\{y(\rho_i + \sigma_i) + \sigma_i\lambda_a + \rho_i\lambda_b\}}{(y + \lambda_a)\,(y + \lambda_b)}$$

En identifiant, on trouve

pour $F_2(y)$ $\left\{\begin{array}{l}\alpha = \sigma_2 + \rho_2 \\ \beta = \sigma_2\lambda_a + \rho_2\lambda_b\end{array}\right.$

avec $\rho_2 = \dfrac{\lambda_a\alpha - \beta}{\lambda_a - \lambda_b}$

et $\sigma_2 = \dfrac{-\lambda_b\alpha + \beta}{\lambda_a - \lambda_b}$

et pour $F_3(y)$ $\left\{\begin{array}{l}\gamma = \rho_3 + \sigma_3 \\ \delta = \rho_3\lambda_b + \sigma_3\lambda_a\end{array}\right.$

avec $\rho_3 = \dfrac{\lambda_a\gamma - \delta}{\lambda_a - \lambda_b}$

et $\sigma_3 = \dfrac{-\lambda_b\gamma + \delta}{\lambda_a - \lambda_b}$

Les fonctions $f_2(t)$ et $f_3(t)$ seront donc

$$f_2(t) = Q_2^*(t) = \frac{\lambda_a\alpha - \beta}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_a t} + \frac{-\lambda_b\alpha + \beta}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_b t}$$

$$f_3(t) = Q_3^*(t) = \frac{\lambda_a\gamma - \delta}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_a t} + \frac{-\lambda_b\gamma + \delta}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_b t}$$

or $$Q^*(t) = Q_2^*(t) + Q_3^*(t)$$

soit $$Q^*(t) = \frac{\lambda_a(\alpha + \gamma) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_a t} - \frac{\lambda_b(\alpha + \gamma) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b} e^{-\lambda_b t}$$

III.4. ACQUISITION DES DONNEES CINETIQUES

III.4.1. DECOMPOSITION DES COURBES D'EXSORPTION

Expérimentalement on obtient des courbes à structure tripartite si l'on part de $t = 0$. En fait, l'échange entre paroi et milieu extérieur n'étant pas limité par une surface mais par un volume, la cinétique correspondante n'a, *a priori*, aucune raison d'être du type exponentiel. Aussi, on ne s'intéressera qu'aux points expérimentaux correspondant à $t > \bar{t}$ ($\bar{t}$ représentant le temps au bout duquel le compartiment 1 est équilibré avec le milieu extérieur, c'est à dire lorsque $Q_1^* = 0$).

On a alors des courbes bipartites, décrites par l'équation

$$Q^{*}(t) = Q_a^{*} e^{-\lambda_a t} + Q_b^{*} e^{-\lambda_b t}$$

avec $$Q_a^{*} = \frac{\lambda_a(\alpha + \beta) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b}$$

et $$Q_b^{*} = - \frac{\lambda_a(\alpha + \beta) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b}$$

Par méthode classique de régression des exponentielles, on obtient, pour chaque cinétique d'efflux, λ_a, λ_b, Q_a^{*} et Q_b^{*}.

Les figures III.1 et III.2 représentent deux cinétiques d'efflux obtenues respectivement avec ^{42}K et ^{86}Rb.

III.4.2. RECHERCHE DES CARACTERISTIQUES CELLULAIRES DE L'ECHANGE DANS LE CAS D'UNE ACTIVITE SPECIFIQUE DE DEPART IDENTIQUE POUR TOUS LES COMPARTIMENTS

A titre d'exemple, nous conduisons le calcul des constantes k_{ij} dans le cas de l'essai représenté par la figure III.2 et qui est réalisé sur des plantes préalablement cultivées sur milieu nutritif où la moitié de la teneur habituelle en potassium a été remplacée par du rubidium marqué au ^{86}Rb pendant toute la durée de la culture.

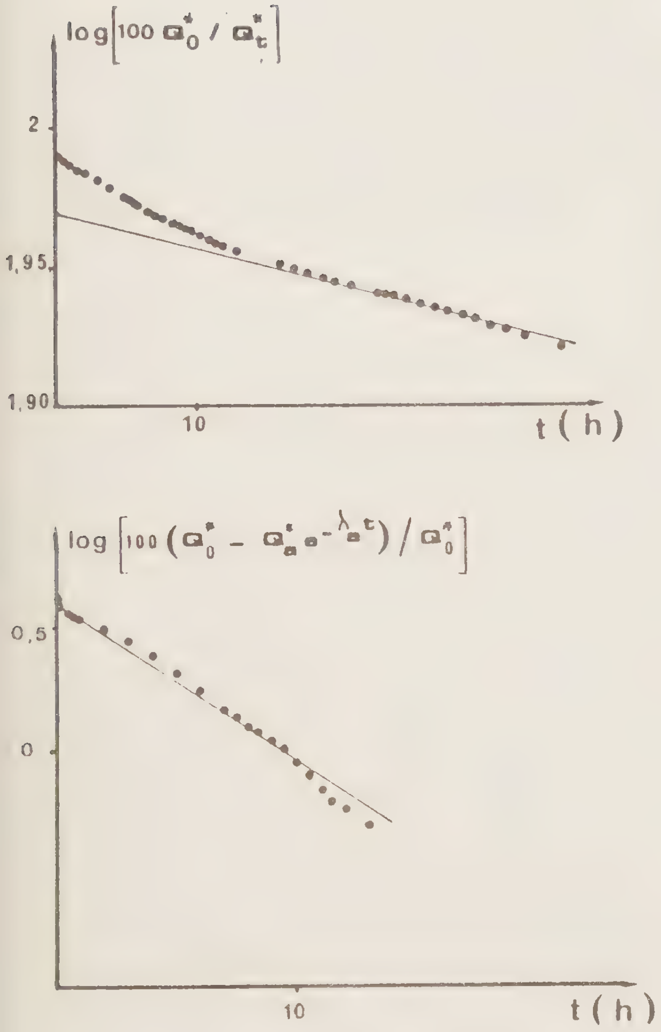

Fig. III.1

Cinétique d'efflux du ^{42}K :

décomposition du processus
en exponentielles successives

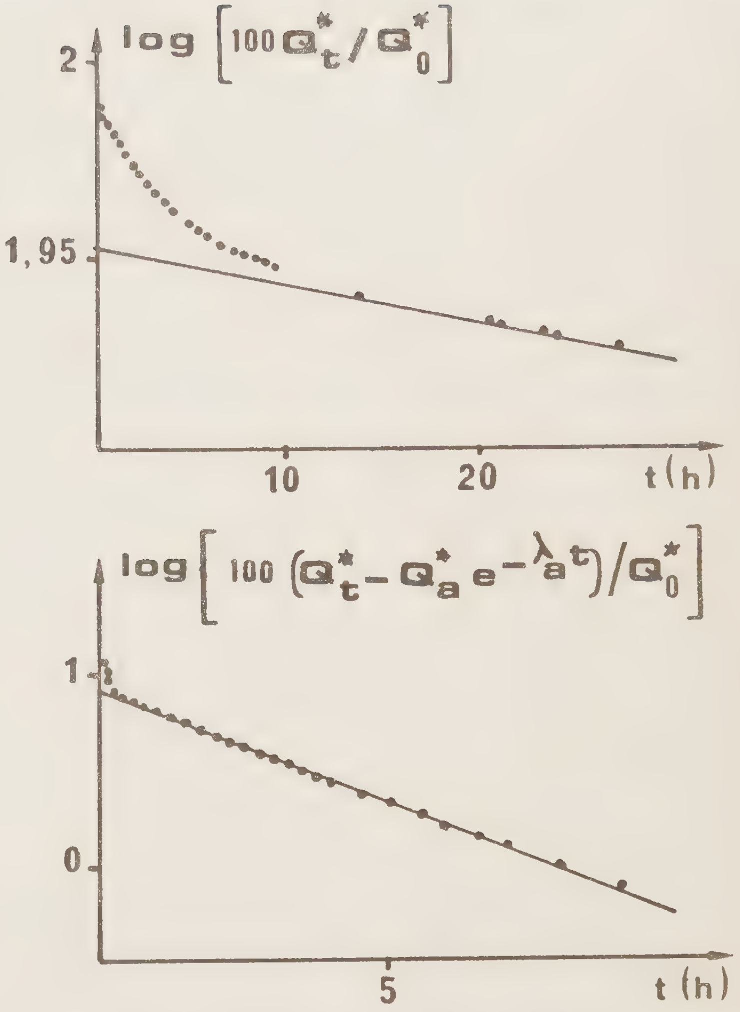

Fig. III.2

Cinétique d'efflux du ^{86}Rb :

décomposition du processus
en exponentielles successives

III.4.2.a <u>Calcul théorique</u>

Les constantes k_{ij} sont données par

$$\frac{k_{12}}{V_1} = \frac{\Phi_{12}}{Q_1} \tag{28}$$

$$\frac{k_{21}}{V_1} = \frac{\Phi_{21}}{Q_2} \tag{29}$$

$$\frac{k_{23}}{V_2} = \frac{\Phi_{23}}{Q_2} \tag{30}$$

$$\frac{k_{32}}{V_3} = \frac{\Phi_{32}}{Q_3} \tag{31}$$

et l'on constate que leur détermination nécessite la connaissance des Φ_{ij} et des Q_i que l'on peut atteindre à l'aide d'équations judicieusement choisies.

Les conditions étant celles d'une charge longue, nous pouvons écrire

$$\frac{Q_2^{\star}(0)}{Q_2} = \frac{Q_3^{\star}(0)}{Q_3} \tag{32}$$

$$\Phi_{12} = \Phi_{21} \tag{33}$$

$$\Phi_{23} = \Phi_{32} \tag{34}$$

D'autre part

$$Q = Q_1 + Q_2 + Q_3 \tag{35}$$

De plus, le développement mathématique exposé au § III.3.2. fournit les équations

$$\lambda_a + \lambda_b = \frac{\Phi_{32}}{Q_3} + \frac{\Phi_{21}}{Q_2} + \frac{\Phi_{23}}{Q_2} \tag{36}$$

$$\lambda_a \lambda_b = \frac{\Phi_{21}\Phi_{32}}{Q_2 Q_3} \tag{37}$$

$$\alpha = Q_2^{\star}(0) \tag{38}$$

$$\beta = \frac{\Phi_{32}}{Q_3}(Q_a^{\star} + Q_b^{\star}) \tag{39}$$

$$\gamma = Q_3^{\star}(0) \tag{40}$$

$$\delta = \frac{Q_3^{\star}(0)}{Q_2}\Phi_{21} + \frac{\Phi_{23}}{Q_2}(Q_a^{\star} + Q_b^{\star}) \tag{41}$$

$$Q_a^{\star} = \frac{\lambda_a(\alpha + \gamma) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b} \tag{42}$$

$$Q_b^{\star} = -\frac{\lambda_b(\alpha + \gamma) - (\beta + \delta)}{\lambda_a - \lambda_b} \tag{43}$$

$$Q_2^{\star}\ (0) + Q_3^{\star}\ (0) = Q_a^{\star} + Q_b^{\star} \qquad (44)$$

On dispose d'un système de 13 équations que l'on peut réduire, par élimination des paramètres intermédiaires, à un système plus simple, où n'apparaissent que les Φ_{ij} et les Q_i en fonction de paramètres accessibles à l'expérience.
Un calcul très approximatif qui néglige Q_2 devant Q_3, dans certaines des équations, permet d'atteindre l'ordre de grandeur des Q_i et Φ_{ij} par l'intermédiaire des équations suivantes :

$$\Phi_{12} = \Phi_{21} = Q_2 \frac{\lambda_a \lambda_b (Q_a^{\star} + Q_b^{\star})}{\lambda_a Q_a^{\star} + \lambda_b Q_b^{\star}} \qquad (45)$$

$$\Phi_{31} = \Phi_{13} = Q_3 \frac{\lambda_a Q_a^{\star} + \lambda_b Q_b^{\star}}{Q_a^{\star} + Q_b^{\star}} \qquad (46)$$

$$Q_3 = Q_1 \cdot \frac{(\lambda_a Q_a^{\star} + \lambda_b Q_b^{\star})^2}{Q_a^{\star} Q_b^{\star} (\lambda_a^2 + \lambda_b^2)} \qquad (47)$$

$$Q_2 + Q_3 = Q - Q_1 \qquad (48)$$

III.4.2.b <u>Application numérique</u>

<u>Données expérimentales</u>

$Q = 18{,}18 \quad \mu\text{eq g frais}^{-1}$

$Q^{\star}\ (0) = 5928970 \quad \text{cpm}$

$Q_1^{\star}\ (0) = 117987 \quad \text{cpm}$

$$Q_a^{\star} = 5559740 \text{ cpm}$$

$$Q_b^{\star} = 250795 \text{ cpm}$$

$$\lambda_a = 0{,}0014 \text{ h}^{-1}$$

$$\lambda_b = 0{,}064 \text{ h}^{-1}$$

Résultats

Détermination des Q_i

Les conditions de charge longue permettent d'écrire

$$\frac{Q_1^{\star}(0)}{Q_1} = \frac{Q^{\star}(0)}{Q}$$

d'où $$Q_1 = 0{,}036 \ \mu\text{eq.Rb}^+ \text{ g frais}^{-1}$$

De plus l'équation (48) permet d'écrire

$$Q_2 = Q - (Q_1 + Q_3)$$

soit en tenant compte de l'équation (47)

$$Q_2 = 1{,}61 \ \mu\text{eq.Rb}^+ \text{ g frais}^{-1}$$

En portant cette valeur dans l'équation (48) on trouve

$$Q_3 = 16{,}21$$

Détermination des Φ_{ij}

L'application de la formule (45) donne

$$\Phi_{12} = \Phi_{21} = 0{,}035\ \mu eq.Rb^{+}\ g\ frais\ h^{-1}$$

D'autre part, d'après (46) on a

$$\Phi_{23} = \Phi_{32} = 0{,}066\ \mu eq.Rb^{+}\ g\ frais^{-1}h^{-1}$$

Ces valeurs approximatives des Q_i et des Φ_{ij} ont servi à améliorer, de proche en proche, la valeur du rapport Q_2/Q_3 et, par itérations successives, nous avons pu aboutir à des valeurs des Q_i et Φ_{ij} telles que leur utilisation a permis de retrouver, avec une bonne précision, les valeurs expérimentales de Q_a^* Q_b^*, λ_a et λ_b (cf. tableau III).

Valeurs des constantes k_{ij}

Par application des équations (28), (29), (30) et (31) on trouve

$$\frac{k_{12}}{V_1} = 0{,}087\ h^{-1}$$

$$\frac{k_{21}}{V_2} = 0{,}042\ h^{-1}$$

$$\frac{k_{23}}{V_2} = 0{,}021\ h^{-1}$$

$$\frac{k_{32}}{V_3} = 0{,}002\ h^{-1}$$

Tableau III

Récapitulation des déterminations de constantes

	Valeurs expérimentales	1ère itération $Q_2 + Q_3 = Q_3$	2ème itération $Q_2 + Q_3 = 1,1\ Q_3$	3ème itération $Q_2 + Q_3 = 1,109\ Q_3$
$\Phi_{12} = \Phi_{21}$		0,034	0,0788	0,0675
$\Phi_{23} = \Phi_{32}$		0,066	0,0322	0,03445
Q_2		1,61	1,748	1,6144
Q_3		16,21	16,07	16,2056
$Q_2^{\star}$ (0)		525.062	570.031	526.404
$Q_3^{\star}$ (0)		5.286.501	5.240.503	5.264.130
λ_a	0,0014	0,0014	0,00141	0,00139
λ_b	0,0640	0,0646	0,06409	0,0639
$Q_a^{\star}$	5.559.740	5.833.655	5.517.389	5.562.859
$Q_b^{\star}$	250.795	< 0	293.145	247.675

III.4.3. INTERPRETATION

On peut noter, en particulier, l'équilibration rapide du premier compartiment (paroi) avec le milieu extérieur.

Par ailleurs, cette cohérence obtenue à partir d'un modèle cellulaire permet de considérer que le système massif étudié (la *Lemna*) se comporte au total comme si toutes les cellules constitutives étaient très rapidement mises en contact avec le milieu extérieur. En effet, dans leur forme analytique, ces cinétiques d'efflux rappellent celles obtenues par GRIGNON (1974) sur la suspension cellulaire d'Erable.

En ce qui concerne les échanges intercellulaires, tout ce que l'on peut dire, c'est qu'ils sont inapparents, l'analyse des courbes d'efflux n'ayant pas permis de mettre en évidence les composantes correspondantes.

Quoi qu'il en soit, on peut penser que la paroi pectocellulosique, quelle que soit sa position dans l'épaisseur du tissu s'équilibre très rapidement avec le milieu extérieur mais avec la possibilité d'acquérir une concentration différente du fait de son caractère d'échangeur d'ions.

Il est probable que seuls les franchissements du plasmalemme et du tonoplaste constituent des étapes plus ou moins limitantes. Ceci présente un intérêt dans le mesure où, dans l'étude de l'absorption, ce que nous avons mesuré entre la première et la deuxième heure correspondrait aux flux d'ions à travers le plasmalemme c'est à dire en définitive au remplissage progressif du cytoplasme.

Il va sans dire qu'une telle description des mouvements et de la répartition des ions au sein de la cellule, essentiellement indirecte, demande à être vérifiée par "une étude quantitative directe sur la localisation endocellulaire des ions absorbés" (HELLER 1974).

III.4.4. CONSEQUENCE : IMPORTANCE DE LA REEXSORPTION AU COURS D'UNE CINETIQUE D'ABSORPTION

La quantité de radioactivité Q_2^* incorporée au temps t dans le cytoplasme est

$$Q_2^* (t) = \Phi_{12} S_1 t$$

Dans ce même compartiment, l'activité spécifique S_2 sera

$$S_2 = \frac{Q_2^{\star}(t)}{Q_2}$$

soit

$$S_2 = \frac{\Phi_{12} S_1 t}{Q_2}$$

La quantité qui en ressort, $Q_s^{\star}$, au temps t est donnée par

$$Q_s^{\star}(t) = \int_0^t \Phi_{21} S_2 dt$$

$$Q_s^{\star}(t) = \int_0^t \frac{\Phi_{21} \Phi_{12} S_1 t}{Q_2} dt$$

$$Q_s^{\star}(t) = \frac{\Phi_{21} S_1 \Phi_{12}}{Q_2} \cdot \frac{t^2}{2}$$

La quantité mesurée expérimentalement est

$$Q_m^{\star} = Q_2^{\star} - Q_s^{\star}$$

c'est à dire

$$Q_m^{\star} = \Phi_{12} S_1 t - \frac{\Phi_{21} S_1 \Phi_{12}}{Q_2} \cdot \frac{t^2}{2}$$

soit

$$Q_m^{\star} = \Phi_{12} S_1 t \left(1 - \frac{\Phi_{21}}{Q_2} \cdot \frac{t}{2}\right)$$

Le pourcentage d'erreur que l'on commet sur la quantité mesurée Q_m^* pour un temps t sera

$$\Delta = \frac{Q_s^* \times 100}{Q_m^*}$$

soit

$$\Delta = \frac{100\ \Phi_{21}\ t}{2\ Q_2 - \Phi_{21} t}$$

En remplaçant Φ_{21} et Q_2 par leurs valeurs trouvées expérimentalement et en prenant $t = 2$ h (durée habituelle d'une cinétique d'absorption), on a

$$\Delta_{(2\ h)} = \frac{100 \times 0{,}0675}{2 \times 1{,}614 - 0{,}0675 \times 2} = 2{,}2\ \%$$

La correction de la réexsorption est donc négligeable. Il est vrai que ce résultat concerne, en toute rigueur l'ion rubidium. Mais l'on peut raisonnablement penser que l'ordre de grandeur est le même dans le cas de l'ion potassium.

IV - DEFINITION DE LA FORCE D'ECHANGE

Rappelons que le principe de l'interprétation thermodynamique repose sur le fait qu'au voisinage de l'équilibre, chaque flux J est relié aux forces X par une combinaison linéaire du type

$$J_i = \sum_j L_{ij} X_j$$

Tout le problème revient à expliciter les composantes de force intervenant dans un transfert.

Pour un processus de transfert symbolisé par

$$S_e \rightleftarrows S_i$$

la vitesse peut s'écrire, dans le domaine proche de l'équilibre, sous la forme

$$v = \ell \Delta\tilde{\mu} + C \qquad (49)$$

où ℓ est un coefficient de proportionnalité, $\Delta\tilde{\mu}$ la différence de potentiel électrochimique et C , en première approximation, une constante dépendant du métabolisme et des réactions couplées.

En explicitant $\Delta\tilde{\mu}$ dans l'expression (49) on obtient :

$$v = \ell \left[\Delta\mu_0 + RT\ln \frac{(S_e)}{(S_i)} + ZF\Delta\psi \right] + C \qquad (50)$$

où $\Delta\mu_0$ est nul et (S_i) peut être considéré constant, au moins dans les conditions initiales de transfert, où la quantité d'ions S transférés ne modifie pas de façon significative, l'activité interne de S.

La vitesse v est donc, a priori, fonction de $\Delta\psi$ (potentiel membranaire) et de l'activité externe de S.

IV.1. ETUDE EXPERIMENTALE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE

Des mesures de potentiel membranaire ont été effectuées en collaboration avec MORVAN selon la technique habituelle (MORVAN 1972) sur les *Lemna* placées dans des conditions expérimentales proches de celles dans lesquelles ont été réalisés nos essais de cinétique d'absorption ; et, nos vitesses ayant été déterminées entre les deux premières heures, nous avons pensé qu'il était préférable d'effectuer ces mesures de potentiel à l'intérieur du même intervalle de temps et, plus précisément 1 h30 après que les plantes aient été mises en contact avec un milieu d'absorption donné.

La courbe de la figure IV.1 montre que les valeurs de $\Delta\psi$ se distribuent, malgré une dispersion importante, sensiblement sur une horizontale si bien que l'on peut considérer que $\Delta\psi$ est, dans nos conditions expérimentales, relativement indépendant de la concentration du milieu extérieur (pente de 7 mV par décade de concentration).

En fait, si l'on suivait l'évolution du potentiel au cours du temps dès qu'intervient une modification des conditions extérieures, on constate (figure IV 2) que la valeur du potentiel subit une grosse variation suivie d'une phase de réadaptation au cours de laquelle la cellule semble rétablir, peu à peu, son potentiel initial sans doute par la mise en oeuvre de mécanismes de régulation au niveau de la distribution de l'ensemble de ses ions (mouvement de protons, etc...).

$\Delta\psi$ étant en première approximation constant, l'expression (50) peut s'écrire, après réarrangement des termes, sous la forme :

$$v = \ell \left[ZF\Delta\psi - RT\ln(S_i) + \frac{C}{\ell} \right] + RT\ell \ln(S_e)$$

$$v = 2,3\ RT\ell \left[\frac{ZF\Delta\psi}{2,3\ RT} - \log(S_i) + \frac{C}{2,3\ RT\ell} \right] + 2,3\ RT\ell \log(S_e)$$

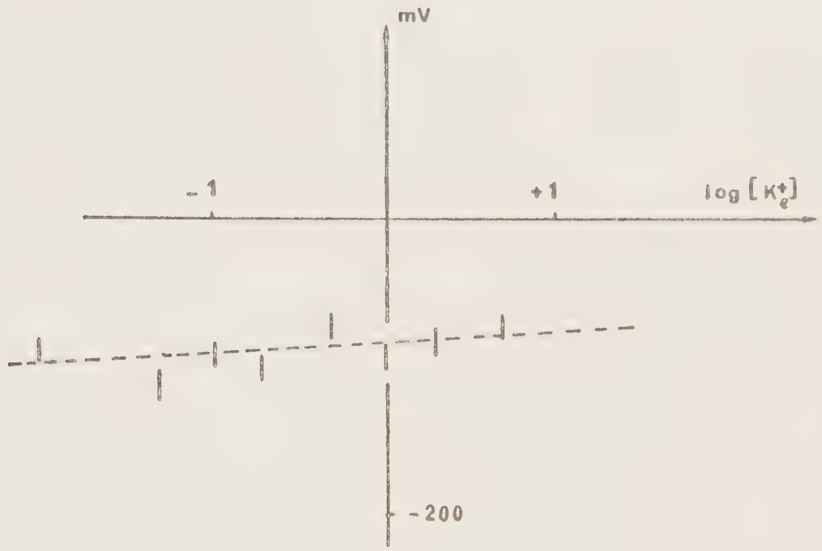

Fig. IV.1. Valeurs du potentiel vacuolaire en fonction du logarithme de la concentration de KCl dans le milieu extérieur

(mesures effectuées après 1 h30 de contact avec la solution externe)

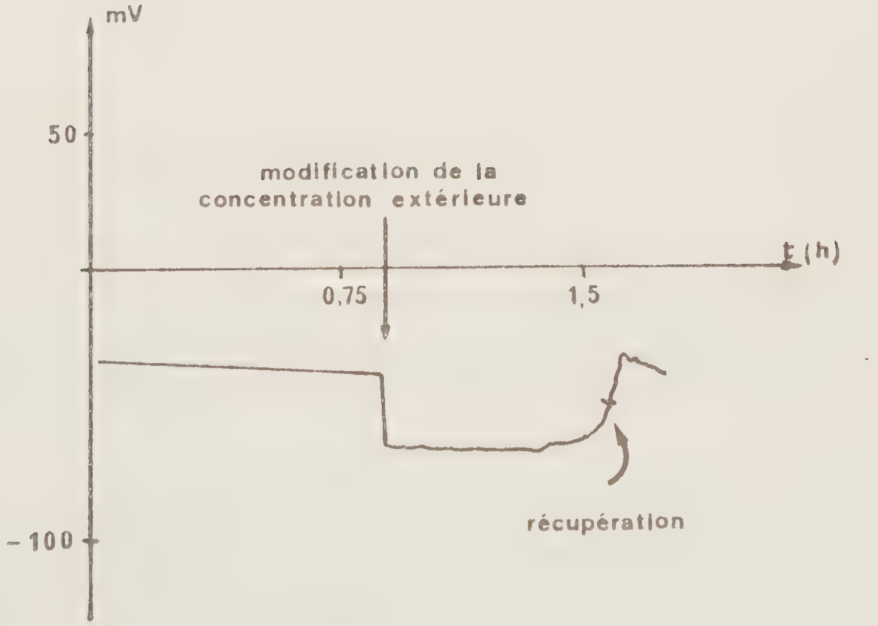

Fig. IV.2. Evolution du potentiel vacuolaire consécutive à une modification de la concentration externe

et en posant

$$\log \pi = \frac{ZF\Delta\psi}{2,3\ RT} - \log(S_i) + \frac{C}{2,3\ RT\ell}$$

on obtient

$$v = 2,3\ RT\ell \left[\log \pi + \log(S_e)\right]$$

soit

$$v = L \log \left[\pi\ (S_e)\right] \qquad (51)$$

avec $L = 2,3\ RT\ell$

Dans ces conditions, on peut considérer que v est proportionnel à $\log(S_e)$ qui reste la seule variable dont dépend la vitesse d'échange de S.

IV.2. ETUDE DU TERME (S_e)

Dans le milieu extérieur, il est raisonnable d'assimiler les activités aux concentrations. En effet, à partir de valeurs du coefficient d'activité de KCl, en solution aqueuse, relevées dans la bibliographie (ROBINSON et STOKES 1970), on a pu calculer les activités correspondant à diverses concentrations en KCl.

La figure IV.3. montre que ces deux grandeurs sont pratiquement les mêmes sur le domaine de concentrations habituellement utilisées et pour lesquelles le processus de transfert reste sensiblement linéaire. Dès lors, si l'on peut faire l'hypothèse que les concentrations au niveau des sites spécifiques de l'absorption cellulaire sont bien celles du milieu extérieur, il devient possible de remplacer dans l'équation (51) le terme (S_e) par $[S_e]$ et l'on obtient (THELLIER 1968)

$$v = L \log \{\pi [S_e]\}$$

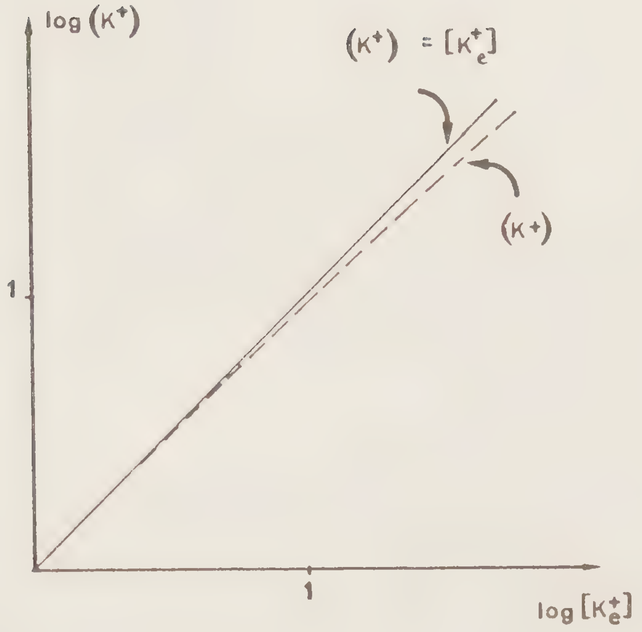

Fig. IV.3.

Activité de l'ion potassium en solution aqueuse

Mais il n'en demeure pas moins que, dans le cas particulier de notre échantillon végétal, l'existence des parois constitue inévitablement un écran entre le milieu extérieur et le plasmalemme ; et, du fait de la distribution de charges fixes (cf. SIEGEL 1962 ; ALBERSHEIM 1965) dans ces parois, dues essentiellement aux radicaux carboxyliques d'acides uroniques (DAINTY, HOPE et DENBY 1960), on peut s'attendre à un échange de DONNAN, si bien qu'en définitive, la concentration, au niveau du plasmalemme peut être très différente de celle que l'on croit avoir imposée au système à partir du milieu extérieur.

D'où l'intérêt d'évaluer l'importance relative des parois et l'influence qu'elles sont susceptibles d'exercer sur l'absorption catalysée. Cette approche a été rendue possible par une collaboration avec des physico-chimistes spécialistes des échangeurs d'ions et, en particulier avec DEMARTY (laboratoire du Professeur SELEGNY).

IV.3. ETUDE DE LA PAROI

Nous avons procédé, sur des parois isolées, d'une part à un dosage des charges fixes et d'autre part à des cinétiques de fixation d'ions potassium et chlorure, au niveau de ces parois, en fonction de la concentration de ces ions dans le milieu extérieur.

IV.3.1. DOSAGE DES CHARGES FIXES

Ce dosage devait permettre une approche quantitative de l'effet DONNAN. Les parois ont été isolées par broyage et centrifugation selon une méthode s'inspirant de celle utilisée par JANSEN *et al.* (1960), et purifiées par des lavages successifs à l'eau bidistillée ; puis leurs charges fixes ont été dosées à l'aide d'une solution de Cl_2Ca à 0,1 N marquée au ^{45}Ca. Cette concentration avait été vérifiée, dans une expérience préliminaire où l'on avait constaté qu'elle était très largement suffisante pour assurer la saturation de tous les sites ; et, dans ces conditions, on peut admettre que l'équilibre de la réaction

est totalement déplacé vers la droite.

Dans le détail, une quantité parfaitement connue de parois (0,26 g frais de parois provenant de 10 g frais de *Lemna* ; ce qui représente 2,6 % du poids frais total) est mise dans 20 ml de Cl_2Ca à 0,1 N marqué au ^{45}Ca et maintenue pendant quatre heures sous agitation douce. La suspension est ensuite filtrée et rapidement rincée pour éliminer la radioactivité superficielle. On détermine, par des mesures en scintillation liquide, la concentration en équivalents de Ca^{++}, donc en charges fixes par gramme de paroi humide.

Une quinzaine d'essais ont pu être effectués sur la préparation et ont conduit à la moyenne de 0,283 ± 0,008 milliéquivalent de calcium par gramme frais de paroi.

Notons que cette valeur est très voisine de celle obtenue par PITMAN *et*

al. (1974), DAINTY et HOPE (1959) sur d'autres échantillons végétaux, et tout à fait comparable aux valeurs trouvées à partir de membranes modèles échangeuses d'ions (FOLLIARD 1974).

IV.3.2. EXCLUSION DE DONNAN

Il s'agit de caractériser la paroi du point de vue de son fonctionnement comme échangeur de DONNAN et de définir expérimentalement son pouvoir d'exclusion.

IV.3.2.a Rappel théorique : équation de DONNAN

Soit une paroi porteuse de charges R^- en contact avec un milieu de concentration c en KCl, pratiquement invariable.

Les conditions initiales et finales sont alors représentées (cf. HELLER 1969), par le tableau IV.

Tableau IV

Distribution des ions chlorure et potassium dans un système de DONNAN

	Paroi			Milieu extérieur	
ions	R^-	K^+	Cl^-	K^+	Cl^-
état initial	a	a	a	c	c
état final	a	y=a+x	x	c	c

Dans le cas de solutions idéales (cf. par ex. HELLER 1969), on a

$$[Cl_i^-]\,[K_i^+] = [K_e^+]\,[Cl_e^-] \qquad (52)$$

soit

$$x(a + x) = c^2$$

d'où

$$x = \frac{-\,a + \sqrt{a^2 + 4\,c^2}}{2}$$

et

$$y = \frac{a + \sqrt{a^2 + 4c^2}}{2} \qquad (53)$$

La présence de R^- implique donc que la concentration en K^+ dans la paroi est supérieure à celle du milieu extérieur puisque, d'après l'équation (53) y est nécessairement plus grand que c.

IV.3.2.b <u>Confrontation à l'expérience</u>

Expérimentalement, nous avons réalisé sur des parois isolées, des cinétiques de fixation de Cl^- et K^+, pour différentes concentrations de ces ions dans le milieu extérieur.

La courbe (a) de la figure IV.4. représente le cas d'une membrane non échangeuse d'ions, donc d'exclusion nulle (lère bissectrice).

La courbe (b) est celle obtenue à partir de nos valeurs expérimentales de fixation de Cl^- sur la paroi. On remarque, en particulier, que cette courbe correspond à un pouvoir d'exclusion différent de celui que prévoit l'application de l'équation idéalisée de DONNAN (cf. figure IV.4., courbe c) dans laquelle a représente la concentration en charges fixes déterminée comme indiqué plus haut.

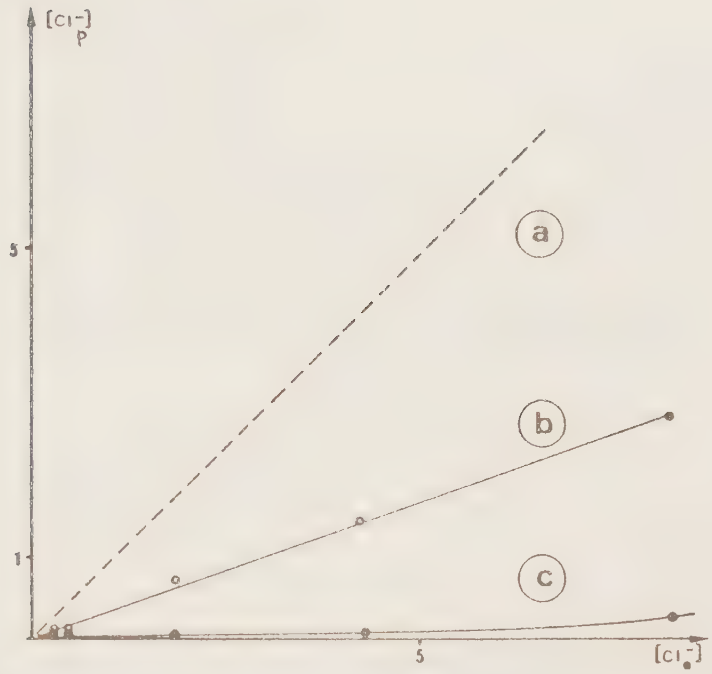

Fig. IV.4. Effet DONNAN dans la paroi
(a) courbe d'exclusion nulle
(b) courbe expérimentale
(c) courbe calculée à partir de l'équation idéalisée de DONNAN

Cet écart traduit le fait que la loi de DONNAN ne peut être écrite sous sa forme simplifiée (équation 52) mais qu'elle doit plutôt s'écrire sous la forme

$$\gamma_i^- \gamma_i^+ [Cl_i^-] [K_i^+] = \gamma_e^- \gamma_e^+ [Cl_e^-] [K_e^+]$$

soit

$$\gamma_i^- \gamma_i^+ [Cl_i^-] [K_i^+] = \gamma_e^{\pm 2} [Cl_e^-] [K_e^+]$$

avec $\gamma_e^{\pm}$ coefficient d'activité moyen

γ_i^- coefficient d'activité du chlore à l'intérieur

γ_i^+ coefficient d'activité du potassium à l'intérieur

On peut alors tirer la valeur de γ_i^+

$$\gamma_i^+ = \frac{\gamma_e^{\pm 2} \; c^2}{\gamma_i^- \, [Cl_i^-] \, [K_i^+]}$$

Si l'on admet que $\gamma_e^{\pm} = 1$ (cas de solutions diluées) et que $\gamma_i^- = \gamma_e^-$ (ce qui est fréquemment le cas pour les échangeurs d'ions) on obtient

$$\gamma_i^+ = \frac{c^2}{[K_i^+] \, [Cl_i^-]}$$

Les valeurs de $[K_i^+]$ et $[Cl_i^-]$ trouvées expérimentalement permettent de calculer, en fonction de la concentration extérieure c, la valeur numérique de γ_i^+ (cf. tableau V).

Tableau V

Valeurs du coefficient d'activité
du potassium dans la paroi

c (mN)	0,26	4,26	8,26
γ_i^+	0,56	0,44	0,56

Si nous désignons respectivement par (K_p^+) et $[K_p^+]$ l'activité et la concentration de l'ion potassium au niveau du plasmalemme, nous pouvons écrire

$$(K_p^+) = \gamma_i^+ \, [K_p^+]$$

De plus, la fixation du potassium sur la paroi est, à la précision de nos mesures, proportionnelle à sa concentration dans le milieu extérieur comme le montre la figure IV.5. Ceci permet d'écrire

$$[K_p^+] = k\,[K_e^+]$$

où k représente la pente de la droite

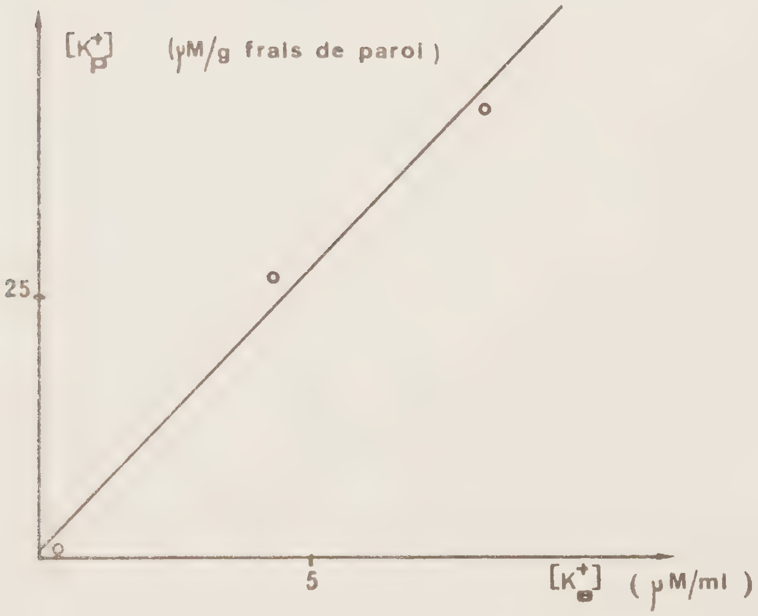

Fig. IV.5. Cinétique de fixation de l'ion potassium sur la paroi isolée

Ainsi, ce qui nous parait devoir être souligné ici c'est que la concentration (ou mieux l'activité) au niveau du plasmalemme est significativement différente de celle du milieu extérieur. Mais l'équation précédente montre que l'on conserve le caractère de proportionnalité entre v et $\log [S_e]$.

Notons enfin qu'en prenant les valeurs trouvées expérimentalement pour γ_i^+ et k (c'est à dire $\gamma_i^+ = 0,5$ et $k = 2,5$), on obtient

$$(K_p^+) = 2,5\,[K_e]$$

Tenir compte des effets DONNAN dans la paroi revient donc à considérer que l'activité réelle du potassium au niveau des sites spécifiques de l'absorption sur le plasmalemme est dans un rapport constant avec la concentration dans le milieu extérieur. En coordonnées semi-logarithmiques la correction de cet effet se traduit par une translation des courbes dans le sens positif sans modification de forme. Pratiquement elle conduit, par rapport aux résultats déjà publiés où l'on négligeait cette correction, à conserver les valeurs de L et à corriger les valeurs de π d'une quantité constante égale à log 2,5 soit à peu près 0,4.

V - APPLICATION DE LA FORMULATION THERMODYNAMIQUE A NOS ESSAIS D'ABSORPTION

V.1. CONDITIONS STATIONNAIRES ET VITESSES INITIALES D'ABSORPTION

La formulation "électrocinétique", que nous avons largement utilisée ici, suppose que l'on doit faire intervenir pour parvenir à interpréter un processus d'absorption, des vitesses obtenues en conditions stationnaires initiales. Pour que cette hypothèse soit satisfaite, nous avons été conduits à définir, aussi bien pour le potassium que pour le rubidium, l'intervalle de temps à l'intérieur duquel l'absorption de ces deux ions se déroule en régime stationnaire, après la brève période d'équilibration des parois.

Les courbes en fonction du temps montrent que l'on obtient, dans le cas du rubidium, une approximation linéaire depuis la fin de la première demi-heure jusqu'à la sixième heure au moins, sur toute la gamme de concentrations qui nous intéresse (de 0,02 à 20 mN). La pente de cette approximation a permis dans chaque cas de mesurer une vitesse v (cf. annexe 4, fig. 1). Dans le cas de l'absorption du potassium, le résultat est différent : on obtient deux approximations linéaires successives et la rupture se situe un peu au delà de la deuxième heure d'absorption (cf. annexe 9, fig. 1) : nos vitesses ont toujours été mesurées par la pente de la première régression linéaire de sorte que nous pouvions considérer que la quantité absorbée n'avait pas modifié, de façon significative, les conditions internes des cellules et, en particulier, l'activité interne de l'ion étudié.

Insistons au passage sur cette différence dans l'aspect des courbes d'absorption du rubidium et du potassium. Ceci conduit à se rallier à l'idée selon laquelle les ions rubidium et potassium, bien que pouvant se remplacer partiellement dans certains processus biologiques du fait de leurs propriétés chimiques voisines (EVANS et SORGER, 1966), ne sont toutefois pas nécessairement soumis rigoureusement au même mécanisme d'absorption et, de ce fait, il n'est pas évident, comme le soulignaient déjà MARSCHNER et SCHIMANSKY (1971), que l'on puisse, sans risque d'erreur, suivre l'absorption du potassium marqué au ^{86}Rb.

Notons enfin que les quantités de potassium ou de rubidium incorporées au cours de l'expérience ne représentent jamais plus de 1,5 % de la teneur totale des plantes en l'un ou l'autre de ces éléments, ce qui est compatible avec l'existence de l'état stationnaire que nous avons supposé.

V.2. ABSORPTION EN FONCTION DES DOSES

Les essais en fonction des doses ont été faits à l'intérieur des intervalles de temps définis ci-dessus mais en n'utilisant plus que trois à quatre points pour déterminer chaque valeur de vitesse d'absorption, aux diverses concentrations essayées.

L'exploitation des vitesses, ainsi obtenues, en fonction du logarithme de la concentration de l'ion (Rb^+ ou K^+) a toujours conduit à l'obtention de courbes présentant une partie en bonne approximation linéaire pour les faibles valeurs de flux puis non linéaire au delà. C'est cohérent avec les prévisions du modèle théorique, écrit sous sa forme complète (cf. équation 18, p. 19).

Pour le rubidium (cf. annexe 4, fig. 2) ainsi que pour le potassium (cf. annexe 9, fig. 8), la pente des approximations linéaires mesure le paramètre extensif L (caractéristique de l'édifice catalytique de l'absorption) et l'intersection avec l'axe des x donne le paramètre de force $\log \pi$. Dans le domaine des fortes concentrations en potassium ou rubidium, le comportement non linéaire s'est finalement révélé peu exploitable : il semble bien qu'une bonne partie de la non linéarité soit tout simplement le résultat d'une superposition d'un flux de diffusion à l'absorption proprement dite. En effet, à partir de l'une de nos courbes (cf. annexe 9, fig. 15 a), nous avons calculé, pour chaque concentration, le pourcentage de diffusion en admettant que ce que l'on mesure à 0°C n'est dû, en première approximation, qu'au seul processus de type diffusif. La figure V. 1 b montre qu'au delà de la concentration millimolaire, la contribution de la diffusion cesse d'être négligeable d'autant que la diffusion réellement mise en jeu, dans nos essais d'absorption à 20°C, peut être en définitive plus importante que celle représentée par la courbe b de la figure V. 1.

En effet, le coefficient de diffusion D est relié à la température absolue par l'équation

$$D = A\, e^{-E/RT}$$

où A est une constante, E l'énergie d'activation de l'espèce chimique considérée, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

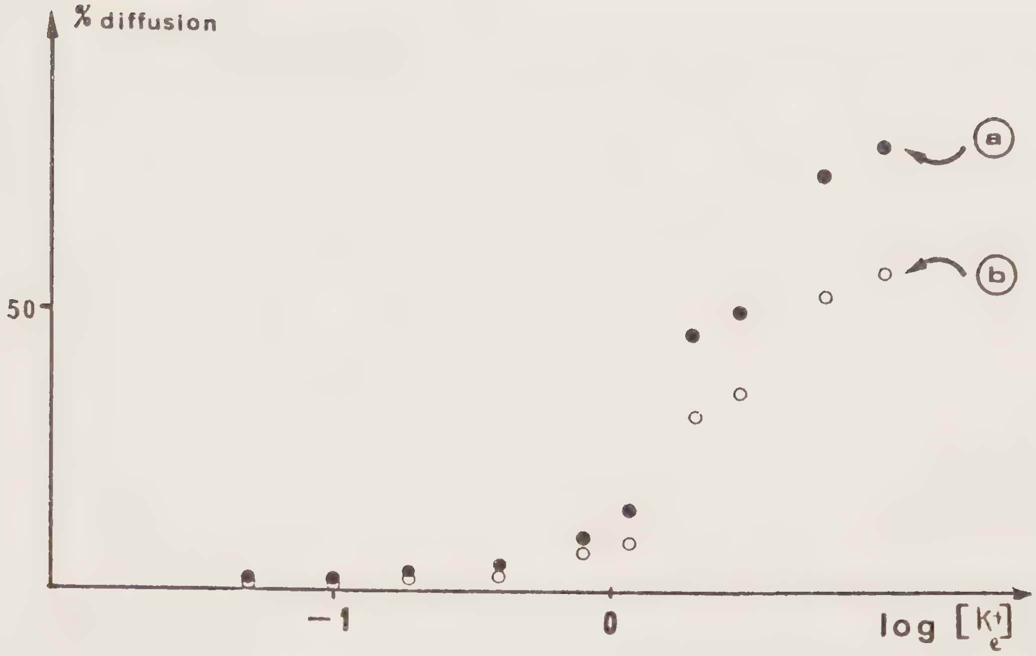

Fig. V.1. Importance relative de la diffusion en fonction du logarithme de la concentration externe de KCl

o % diffusion à 0°C

• % diffusion à 20°C

A 0°C et à 20°C le coefficient de diffusion D est donné respectivement par

$$D_0 = A\, e^{-E/RT_0}$$

$$D_{20} = A\, e^{-E/RT_{20}}$$

Le rapport D_0/D_{20} sera

$$D_0/D_{20} = e^{-E/RT_0 + E/RT_{20}}$$

soit

$$D_0/D_{20} = e^{-E/R \frac{T_{20} - T_0}{T_0\, T_{20}}}$$

En prenant $R = 2$ cal et $E = 3\ 000$ cal, ce qui est généralement le cas pour des ions en solution aqueuse (LEVICH 1962) on obtient

$$D_0/D_{20} = 0,7$$

soit

$$D_{20} = \frac{D_0}{0,7}$$

La diffusion à 20°C, calculée à l'aide de l'équation précédente est décrite par la courbe a de la figure V.1.

On note en particulier que dans un domaine relativement restreint de concentrations (< 1 mM/l), la composante diffusive n'excède guère 6 à 7 % de sorte que l'on peut admettre que la détermination des paramètres π, L et ε est suffisamment précise pour pouvoir raisonnablement discuter ces paramètres.

Par contre, en raison de l'importance de la diffusion dans le domaine des concentrations élevées, l'évaluation des paramètres λ et m reste nécessairement entachée d'erreur d'autant que cette évaluation nécessite une double transformation graphique (THELLIER 1968). Enfin, le terme non linéaire obtenu à partir d'une analogie avec ce qui se passe dans le cas des semi-conducteurs, n'est pas forcément le meilleur que l'on puisse utiliser pour rendre compte de la distribution des points expérimentaux.

V.3. CAS D'UNE INTERACTION COMPETITIVE : MODIFICATION DU PARAMETRE π

La mise en oeuvre d'une compétition entre deux ions suffisamment voisins chimiquement pour pouvoir être transportés par le même édifice membranaire spécifique, devait conduire à une modification de π par l'introduction d'un couplage entre l'absorption de l'un et de l'autre des deux ions considérés.

Cette hypothèse a pu être vérifiée à partir d'expériences réalisées sur la compétition Rb^+/K^+ et largement décrites dans l'annexe 5.

Rappelons, pour mémoire, que l'effet du rubidium sur l'absorption du

potassium, comme celui du potassium sur l'absorption du rubidium se traduit par une diminution systématique du paramètre π (cf. Tableau de l'annexe 5), sans modification des dispositifs catalytiques membranaires de l'absorption de l'un ou de l'autre des deux ions (pas de modification de L).

Une telle interaction est bien du type compétitif comme le prévoit la formulation électrocinétique et l'on constate bien, sur chacun des graphiques de la figure de l'annexe 5, un bon parallèlisme entre les régressions linéaires correspondant aux réactions perturbées et non perturbées en coordonnées ($\log [S_e]$, v).

De plus, la même figure montre que, dans le cas des réactions non perturbées (absorption d'ions K^+ en l'absence de rubidium et inversement), l'absorption du potassium est dans l'ensemble plus rapide que celle du rubidium. Cette absorption plus rapide du potassium se traduit par des valeurs de L et $\log \pi$ nettement plus élevées que celles correspondant à l'absorption du rubidium. Ceci suggère la possibilité de réactions couplées au transfert spécifique de l'ion potassium ($\pi_{K^+} > \pi_{Rb^+}$) mais également l'existence d'une plus grande quantité de protéines catalysant son transfert ($L_{K^+} > L_{Rb^+}$).

Tout ceci peut être repris de façon plus précise, dans le cadre de la relation et du théorème d'ONSAGER ainsi que nous avons commencé à le faire (cf. annexes 7 et 8).

V.4. EFFET DES IONS ALCALINO-TERREUX SUR L'ABSORPTION DU RUBIDIUM ET DU POTASSIUM

V.4.1. MODIFICATION DES PARAMETRES π ET L

Sur l'un et l'autre de ces ions alcalins la présence de calcium ou de magnésium (essayé seulement sur l'absorption du potassium) dans le milieu extérieur diminue la pente L de l'approximation linéaire. Ceci correspondrait à une inhibition des systèmes catalytiques de l'absorption de ces deux ions (cf. annexe 4 pour Rb^+ et annexes 6 et 9, fig. 9 pour K^+). En ce qui concerne le paramètre de force π, le résultat diffère selon la nature de l'ion étudié : pratiquement sans effet sur π dans le cas du rubidium (cf. Tableau de l'annexe 4), le calcium augmente de façon significative ce paramètre dans le cas du potassium (cf. annexe 6 et Tableau II de l'annexe 9). Il exerce donc, sur celui-ci, outre l'effet inhibiteur par diminution de L, un effet activateur probablement lié à un couplage métabolique car très dépendant de la température. Ce

double effet du calcium peut expliquer, au moins pour une part, les divergences constatées dans la bibliographie (où il est présenté globalement tantôt comme activateur et tantôt comme inhibiteur de l'absorption du potassium). Tout dépend finalement de l'importance relative de l'un et de l'autre des deux effets et des conditions expérimentales dans lesquelles on opère (domaine de concentrations, etc...). Des essais en présence de magnésium ont montré qu'il n'y a pratiquement pas de modification de π, ou peut être même une légère diminution (cf. annexe 9, fig. 10).

Mais l'on pouvait se demander si l'effet supposé activateur du calcium dans le domaine des faibles concentrations en potassium n'était pas tout simplement dû à une différence de flux d'anions chlorure résultant d'une différence de mobilité entre les ions calcium et les ions magnésium. Des essais ont donc été entrepris où l'on a comparé l'absorption du potassium en présence de calcium apporté parallèlement sous forme de Cl_2Ca et de SO_4Ca.

Fig. V.2. Absorption de potassium en présence de calcium apporté sous forme de chlorure (o) ou sous forme de sulfate (•)

La figure V.2. tend à montrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les pentes des deux régressions linéaires obtenues (les pentes sont respectivement de 13,48 et 13,29). Dans ces conditions, la nature de l'anion d'accompagnement ne semble pas intervenir dans l'effet d'activation observé.

Par ailleurs, l'effet du calcium sur la force ne semble pas intervenir au niveau du potentiel membranaire. La figure V.3. montre, qu'en dépit d'une large dispersion des points expérimentaux, il n'y a pas de différence significative lorsque le milieu extérieur contient l'un ou l'autre des deux ions alcalino

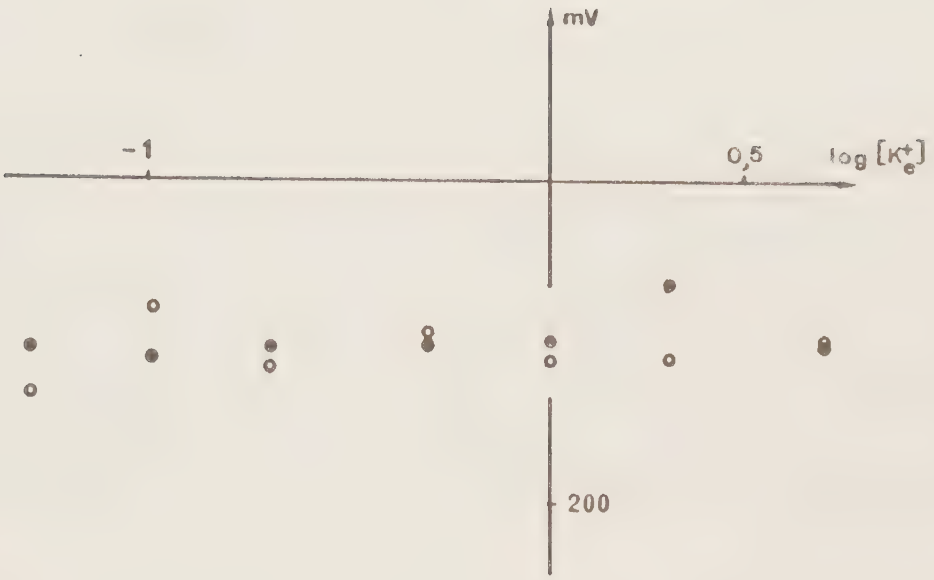

Fig. V.3. Variation du potentiel vacuolaire en fonction du logarithme de la concentration de KCl

● en présence de Mg^{++}

○ en présence de Ca^{++}

terreux. Ainsi, l'hypothèse d'un éventuel effet du calcium sur le potentiel électrique ne pouvant être retenue, on peut penser qu'il agirait sur certaines réactions de couplage par l'intermédiaire d'ATPases intervenant, de façon spécifique, dans le transfert du potassium. Mais ce n'est là qu'une hypothèse dont la validité devra être éprouvée par une étude de l'activité ATPasique, en relation avec des ions alcalino-terreux, dans un homogénat enrichi en plasmalemme.

V.4.2. MODIFICATION DU PARAMETRE ε

Nous venons de voir que les ions calcium ou magnésium avaient le même effet sur L. Il paraissait intéressant de voir si cette modification des systèmes catalytiques était de nature purement quantitative ou au contraire structurale. Or ceci peut s'étudier par la façon dont le paramètre L dépend de la température (THELLIER, THOIRON et THOIRON 1971).

Pratiquement, nous avons vérifié, dans un domaine de température compris entre 0°C et 20°C, qu'il y avait bien une relation linéaire entre log 1/L et 1/T comme le prévoit l'équation (19) écrite sous la forme

$$\log 1/L = \varepsilon/2{,}3\,k \cdot \frac{1}{T} + c^{te}$$

Ceci permet d'évaluer ε (par la pente) dans le cas de réactions non perturbées ou perturbées par des ions calcium ou magnésium. Ces essais, décrits par les figures II et 12 de l'annexe 9 montrent que le calcium ou le magnésium, à la concentration de 1 à 2 mN, modifient largement le paramètre de structure (ε) par rapport à ce qu'il est lorsque le milieu est privé, autant qu'il est possible d'ions alcalino-terreux (cf. Tableau III, annexe 9). Cette sensibilité des systèmes catalytiques de l'absorption à la présence d'ions alcalino-terreux n'est pas sans rappeler celle que certains auteurs (MARME, BOISARD et BRIGGS 1973 ; MARME, MACKENZIE, BOISARD et BRIGGS 1974) ont pu constater sur des homogénats enrichis en plasmalemme et dans lesquels l'addition d'ions alcalino-terreux à des doses relativement voisines de celles habituellement utilisées dans nos essais, provoque l'apparition de structures plus ou moins organisées (microvésicules).

VI - CONCLUSION GENERALE

Parvenu au terme de cet exposé, il me reste à tirer les principales conclusions de ce travail.

Nous avons vu que les processus d'échanges transmembranaires ont été classiquement interprétés et discutés à l'aide de modèles pour la plupart mécanistiques, basés sur une analogie d'écriture entre processus membranaire et processus enzymatique en milieu homogène.

Mais nous avons souligné les difficultés et surtout les limites qu'imposent ces modèles, dès lors qu'il s'agit d'un système où l'existence d'une structure, même parfaitement connue, rendrait pratiquement impossible la formulation de lois statistiques appropriées. La conséquence immédiate d'une telle difficulté est que, dans le cas particulier d'un échange transmembranaire, les paramètres K_m et V_m perdent toute signification moléculaire pour ne plus rester que des paramètres abstraits d'une forme analytique posée *a priori*. POLONOVSKI (cité par THOMAS 1971) écrivait qu'"une des limites de nos connaissances provient de ce qu'il est difficile de transposer les résultats obtenus en milieu homogène aux structures intracellulaires qui relèvent des lois des réactions hétérogènes".

Ainsi, devant l'insuffisance des données relatives à la structure fine des systèmes biologiques, on peut essayer (et c'est ce que nous avons fait) une formulation phénoménologique reliant les flux du processus étudié aux forces qui lui sont associées.

Du point de vue de la force d'échange, nous pouvons dire qu'elle présente deux composantes : une composante d'origine externe, liée à la concentration de l'ion étudié dans le milieu extérieur ; et une composante d'origine métabolique, apparemment sans relation avec le potentiel électrique membranaire et susceptible d'intervenir sur le processus d'échange dans certaines conditions expérimentales (présence d'ions Ca^{++}, d'ions compétiteurs, ...). Notons par ailleurs que l'étude physico-chimique de la paroi pectocellulosique montre qu'elle se comporte comme un système échangeur de cations (système de DONNAN) : la conséquence pratique en est la création, au niveau du plasmalemme, d'une

concentration plus importante que celle réalisée dans le milieu extérieur et dont il faut tenir compte.

Nos échanges ayant été formulés en termes de flux, il était important pour nous de préciser la signification de ces flux à partir de cinétiques d'exsorption. Ceci a conduit à des résultats en accord avec l'existence d'une structure cellulaire à trois compartiments en série, conformément au modèle théorique choisi. De plus, l'ordre de grandeur des constantes d'échange montre que les flux mesurés entre les deux premières heures correspondent bien au franchissement du plasmalemme. Nous avons également constaté que la réexsorption reste négligeable puisqu'elle ne représente, après deux heures d'absorption, que 2 % du flux vers le cytoplasme.

L'application de la formulation thermodynamique à nos essais d'absorption a conduit à des résultats cohérents avec le modèle théorique proposé (THELLIER 1968) et présentant un intérêt sur le plan de la physiologie de l'absorption des alcalins (et en particulier de l'ion potassium) en relation avec les ions alcanino-terreux. C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence un double effet du calcium sur l'absorption du potassium : un effet inhibiteur sur les structures catalytiques du transfert (effet également observé lorsque l'on remplace le calcium par le magnésium) et un second effet, cette fois spécifique du calcium, sur l'ensemble des forces que l'on peut considérer comme constantes dans nos conditions expérimentales (activité interne de l'ion, métabolisme, potentiel électrique, etc...).

Il n'est pas exclu que cet effet se situe au niveau de l'activité de certaines ATPases dont on sait par ailleurs qu'elles peuvent être calcium-dépendantes (KYLIN et KAHR 1973) et qui peuvent intervenir dans les réactions couplées au transfert de l'ion potassium.

Rôle inhibiteur et rôle activateur du calcium semblent simultanés ; mais, de leur importance relative dépendrait l'effet global observé. Dans nos conditions expérimentales, nous avons toujours constaté une prédominance de l'effet activateur aux faibles concentrations en potassium et un effet d'inhibition dans le domaine des fortes concentrations.

Enfin, nous avons mis en évidence une inhibition compétitive, au sens thermodynamique, entre deux ions alcalins de structure voisine (K^+ et Rb^+) en tentant, toujours sur le domaine où la relation flux/force est linéaire, d'en préciser l'écriture à partir des conceptions d'ONSAGER.

Pour conclure, nous dirons que ce travail est une approche du problème d'échanges d'ions entre cellule et milieu extérieur ; il n'a pas l'ambition d'expliciter les mécanismes au niveau moléculaire, mais cherche, au contraire, à développer un formalisme apte à décrire les échanges s'effectuant en milieu très structuré, même lorsque les données structurales et topographiques sont encore insuffisantes pour permettre d'élaborer une formulation mécanistique précise.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERSHEIM P., 1965 - The substructure and function of the cell wall. In "*Plant Biochemistry*" *Bonner J. et Varner J.E. ed. Acad. Press. N.Y. and London.*

ATKINS G.L., 1973 - Modèles à compartiments multiples pour les systèmes biologiques. *Gauthier-Villars ed. Paris. Bruxelles-Montréal.*

AYADI A., 1969 - Contribution à l'étude de l'absorption du phosphore par la *Lemna minor L. Thèse 3ème cycle Tunis et Paris.*

BANGE G.G.J., 1959 - Interaction in the potassium and sodium absorption by intact mays seedlings. *Plant and Soil*, II, 17-29.

BANGE G.G.J. et SCHAMINEE-DELLAERT A., 1968 - A comparison of the effect of calcium and magnesium of the separate components of alkali cation. *Plant and Soil*, XXVIII, n°1, 177-181.

BUTLER G.W., 1953, a - Ion uptake by young wheat plants. I. Time course of the absorption of potassium and chloride ions. *Physiol. Plant.*, 6, 594-616.

CARTER O.G. et LATHWELL D.J., 1968 - Effects of temperature on orthophosphate absorption by excised corn roots. *Plant Physiol.*, 42, 1407-1412.

COHEN G.N. et MONOD J., 1957 - Bacterial permeases. *Bact. Rev.*, 21, 169.

CRAM W.J. et LATIES G.G., 1971 - The use of as short term and quasi steady influx in estimating plasmalemma and tonoplast influx in Barley root cells at various external and internal chloride concentrations. *Aust. J. Biol. Sci.*, 24, 633-646.

DAINTY J. et HOPE A.B., 1959 - Ionic relations of cells of chara australis. I. Ion exchange in the cell wall. *Aust. J. Biol. Sci.*, 12, 395-411.

DAINTY J., HOPE A.B. et DENBY C., 1960 - Ionic relations of cells of chara australis. II. The indiffusible anions of the cell wall. *Aust. J. Biol. Sci.*, 13, 267-276.

DOREE M., 1973 - Contribution à l'étude de l'absorption et du métabolisme de l'adenine et des adenines.-N6-substituées chez l'*Acer pseudoplatanus. Thèse, Paris.*

DOREE M., LEGUAY J.J. et TERRINE C., 1972 - Flux de CO_2 et modulation de perméabilité cellulaire chez les cellules d'*Acer pseudoplatanus L. Physiol. vég.*, 10 (1), 115-131.

DUCET G., 1973 - (non publié) Communication à la *Société Française de Physiologie végétale (Lourmarin).*

ELLIS R.J., 1964 - The site of end-product inhibition of sulphate reduction in *Escherichia coli. Biochem. J.*, 93.

ELZAM O.E. et HODGES T.K., 1967 - Calcium inhibition of potassium absorption in corn roots. *Plant Physiol.*, 42, 1483-1488.

ELZAM O.E., RAINS D.W. et EPSTEIN E., 1964 - Ion transport kinetics in plant tissue : complexity of the chloride absorption isotherm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 273-276.

EPSTEIN E., 1955 - Passive permeation and active transport of ions in plant roots. *Plant Physiol.*, 30, 529-535.

EPSTEIN E., 1966 - Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature*, 212, 1324-1327.

EPSTEIN E. et HAGEN C.E., 1952 - A kinetic study of the absorption of alkali cations by Barley roots. *Plant Physiol.*, 27, 457-474.

EPSTEIN E. et LEGGETT J.E., 1954 - The absorption of alkaline earth cations by Barley roots : kinetics and mechanism. *Amer. J. Bot.*, 41, n°10, 785-791.

EPSTEIN E., RAINS D.W. et ELZAM O.E., 1963 - Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by Barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49, 684-692.

EVANS H.J. et SORGER G.J., 1966 - Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 17, 47-76.

FLORKIN M. et STOTZ E.H., 1965 - Comprehensive *Biochemistry*. vol. 13, enzyme nomenclature.

FOLLIARD R., 1974 - Membranes échangeuses de cations, à ionisation variable : acide polyacrylique greffé sur support hydrophile ou hydrophobe. Propriétés électrochimiques. Influence de l'ion Ca^{++}. *Thèse, Rouen.*

GILLET G. et LEFEBVRE J., 1973 - Combined effect of potassium and bicarbonate ions on the membrane potential and electric conductance of *Nitella flexilis*. In "ion transport in plants". *Acad. Press Anderson W.P. London and N.Y.*, 101-112.

GLASSTONE S., LAIDER K.J. et EYRING H., 1941 - The theory of rate processes. *Mac Graw Hill. N.Y.*

GRIGNON C., 1974 - Etude des flux et de la distribution endocellulaire du potassium chez les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus L. Thèse, Paris.*

GRIGNON C. et LAMANT A., 1973 - Distribution de quatre cations dans les cellules libres d'*Acer pseudoplatanus L. C.R. Acad. Sci., Paris*, 276, 1685-1688.

GRUNWALD C., 1968 - Effect of sterols on the permeability of alcohol treated red beet tissue. *Plant Physiol.*, 43, 484-488.

HAGEN C.E. et HOPKINS H.J., 1955 - Ionic species in orthophosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.*, 30, 193-199.

HANDLEY R., METHWALLY A. et OVERSTREET R., 1965 - Effect of calcium upon metabolic and non metabolic uptake of Na and Rb by root segments of *Zea mays. Plant Physiol.*, 40, 513-520.

HELLER R., 1969 - Biologie végétale. II. Nutrition et métabolisme. *Masson et Cie ed., Paris.*

HELLER R., 1974 - L'absorption minérale chez les végétaux. *Masson et Cie ed., Paris.*

HELLER R., GRIGNON C. et RONA J.P., 1974 - Importance of the Cell Wall in the Thermodynamic Equilibrium of ions in Free Cells of *Acer pseudoplatanus L.* In "Membrane Transport in plants". *Zimmermann U. et Dainty J. ed., Springer-Verlag. Berlin Herdelberg N.Y.*

HELLER R., GRIGNON C. et SCHEIDECKER D., 1973 - Study of the efflux and the influx of potassium in cell suspensions of *Acer pseudoplatanus* and leaf fragments of *Hedera canariensis*. In "Ion transport in plants". *Anderson W.P. ed., Acad. Press. London and N.Y.*

HILLMAN W.S., 1961 - The lemnaceae or Duckweeds, a review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev.*, 27, 221-287.

HOAGLAND D.R., 1928 - Lecture on the inorganic nutrition of plants. *Waltham, Mass.*

HOOYMANS J.J.M., 1964 - The role of calcium in the absorption of anions and cations by excised barley roots. *Acta Bot. Neerl.*, 13, 507-540.

JACOBSON L., MOORE D.P. et HANNAPEL R.J., 1960 - Role of calcium in absorption of monovalent cations. *Plant Physiol.*, 35, 352-358.

JANSEN E.P., JANG R., ALBERSHEIM P. et BONNER J., 1960 - Pectic metabolism of growing cell walls. *Plant Physiol.*, 35, 87-97.

JEANJEAN R., 1974 - Le système de transport du phosphate chez *Chlorella pyrenoidosa. Thèse, Marseille.*

KABACK H.R., 1970 - Transport. *Annu. Rev. Biochem.*, 39, 561-598.

KABACK H.R., 1972 - Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 367-416.

KABACK H.R., 1974 - Transport studies in bacterial membrane vesicles. *Science*, vol. 186, n° 4167, 882-892.

KAHN J.S. et HANSEN J.B., 1957 - The effect of calcium on potassium accumulation in corn and soybean roots. *Plant Physiol.*, 32, 312-316.

KEPES A., 1971 - Specific transport systems in microorganisms. *Physiol. vég.*, 9, 11-23.

KYLIN A. et KAHR M., 1973 - The effect of magnesium and calcium ion on adenosine triphosphatases from wheat and oat roots at different pH. *Physiol. Plant.*, 28, 452-457.

LEGGETT J.E. et EPSTEIN E., 1956 - Kinetics of sulphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.*, 31, 222-226.

LEVICH V.G., 1962 - Physicochemical hydrodynamics. *Printice hall, Inc. Englewood Cliffs. N.J.*

LINEWEAVER H. et BURK D., 1934 - The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666.

MAAS E.V. et LEGGETT J.E., 1963 - Uptake of ^{86}Rb and K by excised maize roots. *Plant Physiol.*, 43, 2054-2056.

MACKLIS L., 1944 - The influence of some respiratory inhibitors and intermediates on respiration and salt accumulation of excised roots. *Amer. J. Bot.*, 31, 183-192.

MAC ROBBIE E.A.G., 1971 - Fluxes and compartimentation in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22, 75-96.

MARME D., BOISARD J. et BRIGGS W.R., 1973 - Binding properties *in vitro* of phytochrome to a membrane fraction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 70, n° 12, Part II, 3861-3865.

MARME D., MACKENZIE J.M., BOISARD J. et BRIGGS W.R., 1974 - The isolation and partial characterization of a membrane fraction containing phytochrome. *Plant Physiol.*, 54, 263-271.

MARSCHNER H. et SCHIMANSKY Ch., 1971 - Suitability of using rubidium 86 as a tracer for potassium in studying potassium uptake by barley plants. *Z. Pflanzenernähr*, 128, 129-143.

MICHAELIS L. et MENTEN M.L., 1913 - Die Kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49, 333-369.

MONNIER A. et THELLIER M., 1970 - Interprétation électrocinétique des interactions ioniques, phosphate/arséniate lors de l'absorption par la *Lemna minor*. *C.R. Acad. Sci.*, 270, 2178-2181.

MORVAN H., 1972 - Mesure du potentiel intracellulaire des suspensions cellulaires d'Erable (*Acer pseudoplatanus L.*) *Thèse 3ème cycle, Lille.*

NISSEN P., 1973 - Multiphasic ion uptake roots. In "Ion Transport in Plants". *Anderson W.P. ed., Acad. Press. London and N.Y.*

ONSAGER L., 1931 - Reciprocal relations in irreversible process. *Phys. Review.*, 37, 405 et 38, 2265.

PARDEE A.B., 1968 - Membrane transport proteins. *Science*, 162, n° 3854, 632-637.

PITMAN M.G., LÜTTGE U., KRAMER D. et BALL E., 1974 - Free space characteristics of barley leaf slices. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1, 65-67.

RAINS D.W., SCHMID W.E. et EPSTEIN E., 1964 - Absorption of cations by roots. Effects of hydrogen ions and essential role of calcium. *Plant Physiol.*, 39, 274-278.

RAINS D.W. et EPSTEIN E., 1967, a - Sodium absorption by barley roots : role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.*, 42, 314-318.

RAINS D.W. et EPSTEIN E., 1967, b - Sodium absorption by barley roots : its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. *Plant Physiol.*, 42, 319-323.

ROBINSON R.A. et STOKES R.H., 1970 - Electrolyte solutions. *Butterworths ed., London.*

THOMAS D., 1971 - Elaboration de modèles biologiques structurés à l'aide de membranes porteuses d'enzymes réticulées. *Thèse, Rouen.*

VALLEE M., 1963 - Recherche sur l'exsorption et l'absorption du rubidium par des racines excisées d'Orge. *Thèse, Paris.*

VANGE M.S., HOLMERN K. et NISSEN P., 1974, a - Multiphasic uptake of sulfate by barley roots. I. Effects of analogues, phosphate, and pH. *Physiol. Plant.*, 31, 292-301.

VAN STEVENINCK R.F.M., 1965 - The significance of calcium on the apparent permeability of cell membranes and the effect of substitution with other divalent ions. *Physiol. Plant.*, 18, 54-69.

VIETS F.G., 1944 - Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by excised barley roots. *Plant Physiol.*, 19, 466-480.

WAISEL Y., 1962 - The effect of Ca on the uptake of monovalent ions by excised barley roots. *Physiol. Plant.*, 15, 709-724.

ANNEXES : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - Contribution à l'étude d'interactions ioniques chlorure-borate et iodure-borate lors de l'absorption par la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, 265, 1687-1690 (1967) par MM. Michel THELLIER, Abdelkader AYADI et Mme Claude TROMEUR.

2 - Contribution à l'étude d'interactions ioniques phosphate-borate lors de l'absorption par la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, 265, 1940-1943 (1967) par MM. Michel THELLIER et Abdelkader AYADI.

3 - Interprétation électrocinétique de l'absorption du phosphate par la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, 267, 1839-1842 (1968) par MM. Michel THELLIER et Abdelkader AYADI.

4 - Formulation électrocinétique de l'effet de régulation par le calcium de l'absorption du rubidium chez la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, 271, 1280-1283 (1970) par MM. Abdelkader AYADI et Michel THELLIER.

5 - Interprétation électrocinétique des interactions compétitives réciproques K^+/Rb^+ lors de l'absorption de ces ions par la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, éè", 67-70 (1971) par MM. Abdelkader AYADI, Philippe DEMUYTER et Michel THELLIER.

6 - Application of the electrokinetic formalism to the interpretation of the regulation of overall cellular exchanges of potassium by calcium. *First European biophysics congress. Broda E. Locker A. Springer-Lederer H. ed. Verlag der Wiener Medizinischen Akademie* (1971) by Michel THELLIER and Abdelkader AYADI.

7 - Application des relations et de la loi d'Onsager à l'interprétation d'interactions entre processus cellulaires globaux. *C.R. Acad. SCI. Paris*, 273, 2346-2349 (1971) par M. Michel THELLIER, Mme Thérèse STELZ et M. Abdelkader AYADI.

8 - Application des relations et de la loi d'Onsager à la formulation d'interactions compétitives lors de l'absorption d'ions alcalins par la *Lemna minor L. C.R. Acad. Sci. Paris*, 276, 1053-1056 (1973) par MM. Jean-Paul LASSALLES, Abdelkader AYADI, Alain MONNIER, Mme Thérèse STELZ et M. Michel THELLIER.

9 - Application of an electrokinetic formulation to the study of the effect of alkaline-earth cations on the absorption of K^+ ions by *Lemna minor L. Ann. Bot.*, 38, 677-696 (1974) by M. Abdelkader AYADI, Mme Thérèse STELZ, MM. Alain MONNIER, Jean-Paul LASSALLES and Michel THELLIER.